

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal

Jéssica Naiara dos Santos

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM HÍBRIDOS DE *Eucalyptus grandis* X
Eucalyptus urophylla AFETADOS POR DISTÚRPIO FISIOLÓGICO**

Diamantina

2021

Jéssica Naiara dos Santos

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM HÍBRIDOS DE *Eucalyptus grandis* X
Eucalyptus urophylla AFETADOS POR DISTÚRBIO FISIOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Lourenço de Assis Jr.

Diamantina

2021

Catlogação na fonte - Sisbi/UFVJM

S237e Santos, Jéssica Naiara dos
2021 Expressão gênica diferencial em híbridos de *Eucalyptus grandis*
X *Eucalyptus urophylla* afetados por distúrbio fisiológico
[manuscrito] / Jéssica Naiara dos Santos. -- Diamantina, 2021.
56 p. : il.

Orientador: Prof. Lourenço de Assis Júnior.

Disserta  o (Mestrado em Ciência Florestal) -- Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-
Gradua  o em Ciência Florestal, Diamantina, 2021.

1. Estresses Abióticos. 2. *Eucalyptus* sp. 3. Distúrbio
Fisiológico. 4. Expressão Gênica. 5. RT-qPCR. I. Assis Júnior,
Lourenço de. II. Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

JÉSSICA NAIARA DOS SANTOS

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM HÍBRIDOS DE *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* AFETADOS POR DISTÚRBIO FISIOLÓGICO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nível Mestrado, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Lourenço de Assis Júnior

Data de aprovação: 05/03/2021

Prof. Dr. Sebastião Lourenço de Assis Júnior
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof^a. Dr^a. Janaína Fernandes Gonçalves
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

DIAMANTINA - MG



Documento assinado eletronicamente por **Sebastião Lourenço de Assis Júnior, Servidor**, em 08/03/2021, às 20:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Marcio Moreira, Usuário Externo**, em 09/03/2021, às 07:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janaína Fernandes Gonçalves, Coordenadora**, em 09/03/2021, às 15:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0302288** e o código CRC **87E77595**.

Aos meus pais e professores por todos os ensinamentos
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo suporte e incentivo incondicional;

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Florestal pela oportunidade e apoio financeiro;

Ao professor Marcelo Luiz de Laia por prover valiosos ensinamentos, pela dedicação, paciência e confiança;

Ao professor Sebastião Lourenço de Assis Júnior pelo apoio e confiança;

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal pela amizade e trocas de conhecimento;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Estresses abióticos como baixa ou elevada temperatura, déficit ou excesso de água, alta salinidade, metais pesados e radiação ultravioleta podem limitar o crescimento e desenvolvimento de espécies florestais. A depender da constituição genética da planta e da capacidade em oferecer resposta adaptativa, fatores externos podem ser um desafio para diferentes espécies. Combinações de estresses podem ocasionar efeitos únicos que não podem ser previstos a partir de estressores individuais, nisso, uma multiplicidade de interações fisiológicas pode ser esperada. Plantios florestais brasileiros de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* localizados no sul do estado da Bahia apresentaram distúrbio fisiológico em seu crescimento em maio de 2007. Foi verificado que a interação entre o fator genético e as condições do meio (fatores edáficos, nutricionais e climáticos) poderia ter desencadeado alterações quanto a expressão gênica dos indivíduos. Para identificar possíveis genes responsivos pelo distúrbio a técnica de RT-qPCR é grande aliada. Diante do exposto, o primeiro artigo deste estudo busca definir genes de referência apropriados para serem utilizados como normalizadores nas análises de expressão gênica por meio da RT-qPCR. Já o segundo artigo tem o intuito de detectar alterações na expressão gênica de seis genes envolvidos em diversos estresses abióticos de plantas que podem estar relacionados ao distúrbio fisiológico nos clones.

Palavras-chave: Estresses Abióticos; Distúrbio Fisiológico; *Eucalyptus* sp.; Expressão Gênica; RT-qPCR.

ABSTRACT

Abiotic stresses such as low or high temperature, deficit or excess of water, high salinity, heavy metals and ultraviolet radiation can limit the growth and development of forest species. Depending on the genetic makeup of the plant and its ability to offer an adaptive response, external factors can be challenging for different species. Combinations of stresses can cause unique effects that cannot be due to individual stressors, so that a multiplicity of physiological interactions can be expected. Brazilian forest plantations of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* located in the south of the state of Bahia showed a physiological disturbance in its growth in May 2007. It was found that the interaction between the genetic factor and the conditions of the environment (edaphic, nutritional and climatic factors) may have triggered changes in the individuals' gene expression. To identify possible genes responsive to the disorder, the RT-qPCR technique is a great ally. Given the above, the first article of this study seeks to define reference genes to be used as normalizers in the analysis of gene expression by RT-qPCR. The second article aims to detect changes in the gene expression of six genes involved in several abiotic plant stresses that may be related to the physiological disturbance in the clones.

Keywords: Abiotic Stresses; Physiological Disorder; *Eucalyptus sp.*; Gene expression; RT-qPCR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. REFERÊNCIAS	12

ARTIGO 1: SELEÇÃO DE GENES ENDÓGENOS PARA NORMALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM HÍBRIDOS DE <i>Eucalyptus grandis</i> X <i>Eucalyptus urophylla</i> AFETADOS POR DISTÚRBIO FISIOLÓGICO	13
---	-----------

RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1.INTRODUÇÃO	16
2.MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1.Material Vegetal	17
2.2.Extração de RNA Total	19
2.3.Seleção dos genes de referência para normalização dos dados	19
2.4.Ensaio da RT-qPCR.....	20
2.5.Análise da estabilidade de expressão dos genes de referência candidatos.....	20
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1.Qualidade do RNA Total obtido.....	21
3.2.Qualidade dos oligonucleotídeos.....	21
3.3.Análise da estabilidade e seleção dos genes de referência	21
4.CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

ARTIGO 2: EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM HÍBRIDOS DE <i>Eucalyptus grandis</i> X <i>Eucalyptus urophylla</i> AFETADOS POR DISTÚRBIO FISIOLÓGICO	26
---	-----------

RESUMO.....	27
ABSTRACT	28
1.INTRODUÇÃO	29
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1.Material Vegetal	30

2.2.RNA Total.....	32
2.3.Seleção dos genes de referência para normalização dos dados	32
2.4.Seleção dos genes de Interesse (GOI).....	33
2.5.Ensaio da RT-qPCR	36
2.6.Análise da expressão gênica diferencial	36
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1. RNA Total.....	37
3.2. Análise da expressão gênica diferencial	37
3.3. Genes de Interesse.....	38
4.CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

1. INTRODUÇÃO GERAL

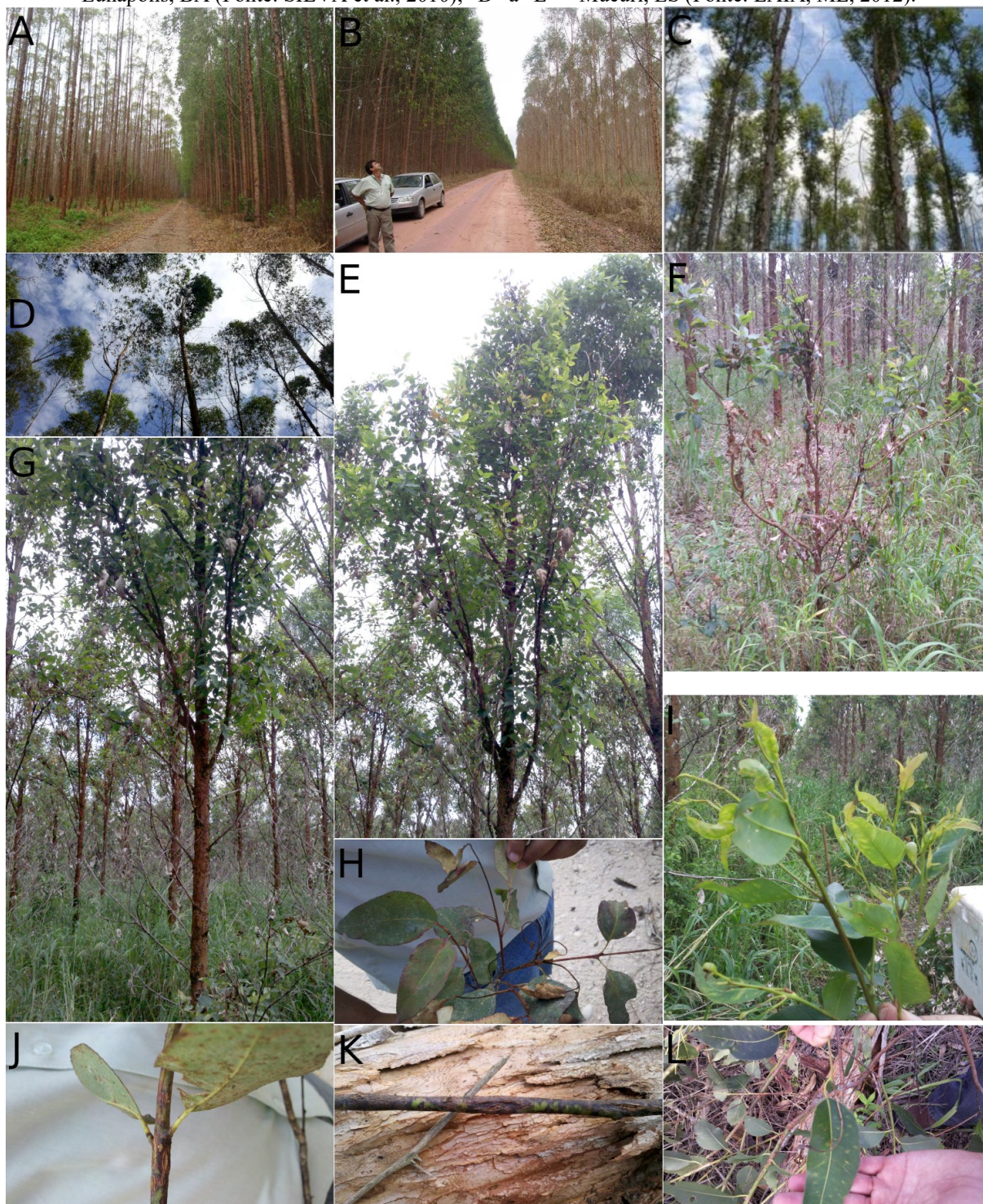
Estresses abióticos como baixa ou elevada temperatura, déficit ou excesso de água, alta salinidade, metais pesados e radiação ultravioleta podem limitar o crescimento e desenvolvimento de espécies florestais. Não obstante, como organismo sésseis, as plantas possuem capacidade de alterar substancialmente seus padrões de expressão gênica em resposta às alterações ambientais. As mudanças transcricionais podem ser adaptações bem-sucedidas que proporcionam tolerância às condições adversas. Todavia, também podem ser adaptações prejudiciais em que a planta é rotulada como sensível às condições. Compreender os mecanismos pelos quais elas percebem e transduzem sinais de estresse para iniciar respostas é de suma importância (HAZEN; WU; KREPS, 2003). Inúmeros genes com diversas funções são induzidos por tensões e vários fatores de transcrição estão envolvidos na regulação de genes induzíveis por estresse.

A depender da constituição genética da planta e da capacidade em oferecer resposta adaptativa, fatores externos podem ser um desafio para diferentes espécies. A interação genótipo x ambiente fornece uma infinidade de efeitos. Assim, um ambiente compatível para um genótipo pode não ser para outro (DES MARAIS; HERNANDEZ; JUENGER, 2013). Combinações de estresses como calor e seca acontecem com grande frequência em condições de campo e ocasionam efeitos únicos que não podem ser previstos a partir de estressores individuais. Nisso, uma multiplicidade de interações fisiológicas pode ser esperada. Respostas às tensões combinadas são controladas por vias de sinalização diferentes e às vezes opostas, que podem interagir e inibir umas às outras (SUSUKI *et al.*, 2014). Decifrar como as plantas percebem os distintos estressores, como os primeiros sinais são transduzidos dentro dela, qual é a diversidade de vias de respostas eliciadas por eles e como são geneticamente determinados é um grande desafio (YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014). Diante disso, a análise da expressão gênica é uma técnica que fornece informações úteis sobre a função de genes, bem como as aplicações e permite caracterizar os genes nas células cuja expressão foi alterada.

Plantios florestais brasileiros de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* localizados no sul do estado da Bahia apresentaram distúrbio fisiológico em seu crescimento em maio de 2007. Os primeiros sintomas observados foram queda intensa de folhas, formação de subcopas, deformação dos ponteiros e encarquilhamento em árvores de 2,5 a 3,0 anos de idade. Nos anos seguintes novos sintomas foram identificados, como: murcha, amarelecimento e seca de folhas, seca dos ponteiros, encarquilhamento da copa, brotação ao longo do tronco,

rachaduras (fissuras) na casca na base do tronco e em galhos jovens, tortuosidade do tronco, bifurcação ou superbrotamento do tronco, culminando com a morte das árvores (Figura 1).

Figura 1 – Sintomatologia ocasionada pelo Distúrbio Fisiológico do Eucalipto (DFE). “A”, “B” e “C” = Eunápolis, BA (Fonte: SILVA et al., 2010); “D” a “L” = Mucuri, ES (Fonte: LAIA, ML, 2012).



Ao pesquisar possíveis causas do distúrbio, algumas condições dos plantios foram relatadas, como: o regular preparo do solo tanto para as plantas assintomáticas como para as

sintomáticas; níveis abaixo do desejado de alguns nutrientes nas linhas de plantas afetadas e não afetadas; alternância na precipitação mensal com aumento considerável em outubro a dezembro de 2006 e março de 2007 e redução acentuada em janeiro, abril e maio de 2007.

Foi verificado que a interação entre o fator genético e as condições do meio poderia ter desencadeado alterações quanto a expressão gênica dos indivíduos. A técnica de RT-qPCR é grande aliada para identificar possíveis genes responsivos pelo distúrbio fisiológico. Diante do exposto, o primeiro artigo deste estudo busca definir genes de referência apropriados para serem utilizados como normalizadores nas análises de expressão gênica, por meio da RT-qPCR. Já o segundo artigo, possui o intuito de identificar possíveis genes responsivos pelo distúrbio nos clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

2. REFERÊNCIAS

DES MARAIS, D. L.; HERNANDEZ, K. M.; JUENGER, T. E. Genotype-by-environment interaction and plasticity: exploring genomic responses of plants to the abiotic environment. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 44, p. 5-29, 2013.

HAZEN, S. P.; WU, Y.; KREPS, J. A. Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. **Functional & Integrative Genomics**, v. 3, n. 3, p. 105-111, 2003.

SUZUKI, N. *et al.* Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 32-43, 2014.

YOSHIDA, T.; MOGAMI, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 21, p. 133-139, 2014.

**ARTIGO 1: SELEÇÃO DE GENES ENDÓGENOS PARA NORMALIZAÇÃO DA
EXPRESSÃO GÊNICA EM HÍBRIDOS DE *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*
AFETADOS POR DISTÚRBIO FISIOLÓGICO**

RESUMO

A reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) é uma técnica importante para analisar diferenças na expressão gênica de indivíduos. Não obstante, uma quantificação precisa e confiável requer normalização dos resultados por meio de genes de controle interno. Nenhum gene apresenta expressão estável em todos os organismos e em todas as condições experimentais. Portanto, recomenda-se, que para cada espécie e/ou cada tipo de experimento e/ou cada tipo de tecido seja realizado um teste com diferentes genes candidatos a normalizadores, a fim de, escolher os mais estáveis e, consequentemente, assegurar a normalização dos genes alvo. Além disso, é aconselhável utilizar ao menos dois genes normalizadores para se obter maior precisão e confiabilidade dos resultados. Diante do exposto, o intuito do estudo foi avaliar a estabilidade de candidatos a genes de referência com objetivo de identificar os mais adequados para a normalização de resultados da expressão gênica diferencial em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* afetados por distúrbio fisiológico. Foram analisados cinco genes constitutivos (EUCONS08, EUCONS21, EGIDH, UBQ e IDH) em tecidos foliares sintomáticos e assintomáticos. A estabilidade da expressão de cada um foi calculada por meio do software GenEx versão 7.0TM com auxílio dos algoritmos geNorm e NormFinder. Os resultados demonstraram que os genes UBQ e IDH caracterizam-se como potenciais marcadores housekeeping em ensaios que visem a avaliação do perfil global de expressão gênica em condições de estresse fisiológico.

Palavras-chaves: *Eucalyptus* sp.; Distúrbio fisiológico; Genes de referência; RT-qPCR; Housekeeping genes; Normalização da expressão gênica.

ABSTRACT

The real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) is an important technique for analyzing differences in individuals' gene expression. However, accurate and reliable quantification requires normalization of results using internal control genes. No gene shows stable expression in all organisms and in all experimental conditions. Therefore, it is recommended that for each species and / or each type of experiment and / or each type of tissue, a test be carried out with different genes that are candidates for normalization, in order to choose the most stable ones and, consequently, guarantee the normalization of target genes. In addition, it is advisable to use at least two normalizing genes to obtain greater precision and reliability of the results. Given the above, the objective of the study was to evaluate the stability of candidates for reference genes, in order to identify the most suitable to normalize the results of differential gene expression in hybrids of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* affected by physiological disorder. Five constitutive genes (EUCONS08, EUCONS21, EGIDH, UBQ and IDH) were analyzed in symptomatic and asymptomatic leaf tissues. The expression stability of each one was calculated using GenEx software version 7.0TM with the aid of the geNorm and NormFinder algorithms. The results demonstrated that the UBQ and IDH genes are characterized as potential markers of housekeeping in assays that aim to evaluate the global profile of gene expression under conditions of physiological stress.

Keywords: *Eucalyptus* sp.; Physiological disorder; Reference genes; RT-qPCR; Housekeeping genes; Normalization of gene expression.

1. INTRODUÇÃO

O fenótipo expresso pela planta é resultado da interação entre o genótipo e o ambiente em que ela está inserida. Diante de condições adversas advindas de estresses bióticos e abióticos o desenvolvimento de espécies florestais pode ser severamente afetado. Indivíduos expostos a estresses podem ter a expressão dos genes alterada, de modo a ocasionar modificações fisiológicas, morfológicas e moleculares refletindo no crescimento e produtividade. Essas mudanças transcricionais podem ser adaptações bem-sucedidas que levam à tolerância ou quando a planta falha em se adaptar ao novo ambiente é rotulada como sensível à condição. O perfil de expressão pode, então, definir respostas tolerantes e sensíveis. Logo, a análise da expressão gênica é essencial para compreensão da sinalização, desenvolvimento de vias metabólicas, processos celulares e vários aspectos da biologia vegetal. A partir de seu estudo é possível identificar genes envolvidos em respostas a estresses (HAZEN; WU; KREPS, 2003).

Para a análise dos processos de expressão gênica e obtenção de transcritos diferencialmente expressos, algumas ferramentas estão disponíveis na biologia molecular. Dentre elas, a reação em cadeia da polimerase reversa em tempo real (RT-qPCR) é uma ferramenta que permite a quantificação de mRNA de maneira simples, altamente precisa e reprodutível (NAVARRO *et al.*, 2015).

A quantificação precisa e confiável por RT-qPCR requer inúmeras padronizações. A normalização dos resultados por meio de genes de controle interno corrige variabilidades inerentes ao RNA, tais como: diferenças na quantidade inicial da amostra, protocolos de extração que podem co-purificar inibidores e discrepâncias de eficiência entre as amostras durante o processo da transcrição reversa e da PCR (BUSTIN *et al.*, 2005).

Genes de referência são aqueles que possuem expressão constante, independente das condições experimentais, dos diferentes tipos de células, estádios de desenvolvimento e/ou tratamento da amostra (WAN *et al.*, 2017). Não obstante, nenhum gene apresenta expressão estável em todos os organismos, em todos os tecidos e todas as condições experimentais. Assim, recomenda-se, que para cada espécie e para cada tipo de experimento seja realizado um teste de normalização para assegurar a estabilidade dos genes. Além disso, é aconselhável utilizar ao menos dois genes para se obter uma maior precisão e confiabilidade dos resultados (MOURA *et al.*, 2012). Diante disso, técnicas e métodos computacionais, tais como os algoritmos geNorm e NormFinder foram desenvolvidos com esse objetivo.

Em maio de 2007, plantios brasileiros com híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* localizados no sul do estado da Bahia apresentaram distúrbio fisiológico. Houve comprometimento no crescimento e produtividade das árvores. Foi verificado que a interação entre o genoma e as condições do meio pode ter desencadeado alterações quanto a expressão gênica dos indivíduos. Um estudo com intuito de identificar possíveis genes responsivos pelo distúrbio fisiológico será realizado por meio da técnica de RT-qPCR. Não obstante, antes, é necessário definir genes de referência apropriados para serem utilizados como normalizadores nas análises. Até o momento não há relatos para seleção de genes endógenos em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* sob tais condições. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo analisar a estabilidade de cinco candidatos a genes endógenos, de modo a identificar e recomendar os mais adequados para a normalização das análises.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF), localizado no Departamento de Engenharia Florestal em parceria com o Laboratório de Biologia Celular e Molecular, localizado no Centro Integrado de Pesquisa e Pós-Graduação em Saúde (CIPq-Saúde), ambos situados no Campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, MG.

2.1. Material Vegetal

Tecido foliar (com e sem sintomas) de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* foram utilizados para as análises. A coleta foi realizada em áreas de plantio de uma Empresa Florestal brasileira localizada no sul do Estado da Bahia, nos municípios de Porto Seguro e Itabela. Por meio de amostragem aleatória simples foram selecionadas três árvores com sintomas (réplicas biológicas) e três árvores sem sintomas (réplicas biológicas) em dois ambientes diferentes. Em cada uma das árvores selecionadas os tecidos foliares foram coletados em triplicata (Tabela 1). As amostras permaneceram acondicionadas em recipiente com nitrogênio líquido e, posteriormente, foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento da extração do RNA Total.

Tabela 1 – Características dos ambientes de coleta e dos materiais genéticos (clones) de eucalipto analisados por meio da técnica de RT-qPCR. PAd2.1 - Argissolo Amarelo; LAdx2.1 - Latossolo amarelo; Dup. = duplicata biológica (árvores diferentes de um mesmo clone); Rep. = replicata (amostras diferentes de uma mesma árvore); Amb. = ambiente; UMO - Unidade de Manejo Operacional; E. = espaçamento.

<i>Pool</i> (Clone)	Dup.	Rep.	Amb.	Estado Fisiológico	Projeto	Talhão	Data de Plantio	UMO	Unidade de solo	Município	E. (m)	Precipitação Média Anual (mm)	Genótipo	Coordenadas Geográficas		
1004	A1.1	A1.1.1	A1.1.2	A1.1.3	A1	Com sintomas	Boleira	013-01	11/09/2007	1	PAd2.1	Porto Seguro	4,00	1.400	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	16°41'01"S/3 9°22'31"W
	A1.2	A1.2.1	A1.2.2	A1.2.3									x			
	A1.3	A1.3.1	A1.3.2	A1.3.3									3,00			
1004	A2.1	A2.1.1	A2.1.2	A2.1.3	A1	Sem sintomas	Jambeiro III	061-01	15/06/2011	1	PAd2.1	Porto Seguro	5,00	1.350	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	16°34'38"S/3 9°25'40"W
	A2.2	A2.2.1	A2.2.2	A2.2.3									x			
	A2.3	A2.3.1	A2.3.2	A2.3.3									2,40			
1004	A3.1	A3.1.1	A3.1.2	A3.1.3	A2	Sem sintomas	Gameleira	041-01	24/01/2011	4	LAdx2.1	Itabela	5,00	1.300	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	16°42'27"S/3 9°36'22"W
	A3.2	A3.2.1	A3.2.2	A3.2.3									x			
	A3.3	A3.3.1	A3.3.2	A3.3.3									2,40			
361	A4.1	A4.1.1	A4.1.2	A4.1.3	A1	Com sintomas	Boleira	012-01	17/09/2007	1	PAd2.1	Porto Seguro	4,00	1.400	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	16°41'02"S/3 9°22'31"W
	A4.2	A4.2.1	A4.2.2	A4.2.3									x			
	A4.3	A4.3.1	A4.3.2	A4.3.3									3,00			
975	A5.1	A5.1.1	A5.1.2	A5.1.3	A1	Sem sintomas	Boleira	003-01	17/09/2007	1	PAd2.1	Porto Seguro	4,00	1.400	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	16°41'43"S/3 9°23'35"W
	A5.2	A5.2.1	A5.2.2	A5.2.3									x			
	A5.3	A5.3.1	A5.3.2	A5.3.3									3,00			

Fonte: Próprio autor.

2.2.Extração de RNA Total

Os tecidos foliares (aproximadamente 100 mg) foram macerados com o uso de disruptor Mini Beadbeater™ (Biospec Products) em tubos de polietileno de 2,0 mL com 3 esferas de aço inoxidável de 3,2 mm de diâmetro resfriados em nitrogênio líquido. Com o auxílio do conjunto de reagentes RNeasy Plant Mini Kit™ (QIAGEN) o RNA total foi purificado, conforme instruções do fabricante. Para remover contaminantes de DNA genômico, as amostras foram submetidas ao tratamento com DNase I™ (Invitrogen).

A integridade do ácido nucleico foi avaliada por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. O critério de avaliação foi verificar a conservação relativa das frações do RNA ribossômico (28S e 18S). O rendimento e grau de pureza foram assegurados por meio da análise em espectrofotômetro Lambda Bio™ (PerkinElmer) em comprimentos de onda (λ) 260, 280 e 230. Uma amostra é considerada de boa qualidade quando a razão $\lambda_{260}/280$ equivale a 1,8 - 2,0 e a razão $\lambda_{260}/230$ equivale a 2,0 - 2,2. As amostras também foram analisadas por meio do fluorômetro Qubit 3™ (Invitrogen).

2.3.Seleção dos genes de referência para normalização dos dados

Por meio de dados prévios disponíveis na literatura, foram selecionados cinco candidatos a genes de referência: EUCONS08, EUCONS21, IDH, EGIDH e UBQ (Tabela 2). Ensaios de PCR convencional foram realizados para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores.

Tabela 2 – Genes de referência, primers específicos e parâmetros. Oligonucleotídeos direto (F) e reverso (R); tamanho de cada oligonucleotídeo em bases (b); tamanho do amplicon em pares de bases (pb) e número de acesso do mRNA do respectivo gene depositado no GenBank (GI).

Genes de Referência	Sequência dos oligonucleotídeos	Tamanho (mers)	Amplicon (pb)	GI
<i>EUCONS08</i>	F - TCCAATCCGAGTCGCTGTCATTGT	24	152	XM_010068769
	R - TGATGAGCCTCTCTGGTTTGACCT	24		
<i>EUCONS21</i>	F-AGAGGTGAAATTCCAGAAGCCCGT	24	155	XM_010049323
	R - CTTCCCTTTGGCTTCCGCCAATTA	24		
<i>IDH</i>	F – AGTTTGAGGCTGCTGGAATC	20	100	XM_010064015
	R – CTTGCATGCCCACACATAAC	20		
<i>EGIDH</i>	F – TGGAAGTGTGAGTCTGG	18	99	XM_010064015
	R – TTAGGACCATGAATGAGGAG	20		
<i>UBQ</i>	F - GAGGGACATCTATCTCTATGAC	22	131	XM_010071338
	R - CAACAGTAAGCACACGAG	18		

Fonte: Próprio autor.

2.4. Ensaio da RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram efetuadas no equipamento StepOne™ RealTime PCR System (Applied Biosystems) com o conjunto de reagentes EXPRESS-One Step SYBR GreenER Kit™, with premixed ROX (Invitrogen). Os reagentes produzem o cDNA e realizam a quantificação do transcrito em uma única reação, em um único tubo. O ensaio contou com três réplicas biológicas (RNA total extraído de três plantas diferentes) e cada réplica biológica contou com duas réplicas técnicas. Foram incluídos controles negativos em que o RNA foi substituído pelo mesmo volume de água de modo a confirmar a especificidade do procedimento. Os procedimentos seguiram as sugestões do fabricante do equipamento e do conjunto de reagentes, com algumas modificações. O volume da reação foi de 10 µl e consistiu em 2,0 µl de RNA, 0,75 µl de água livre de endonucleases (Ambion®), 1 µl do oligonucleotídeo direto, 1 µl do oligonucleotídeo reverso, 0,25 µl do SYBR® Green PCR Superscript mix e 5,00 µl do SYBR® Green PCR Supermix with Rox. O passo para produção do cDNA foi realizado com um ciclo de 45 °C por 30 min e um de 95 °C por 10 min. Em seguida, as amostras foram submetidas a 40 ciclos a 95 °C por 15 s seguido por 65 °C por 1 min e 15 s. Ao final de cada reação foi gerada uma curva de *melting* de 60 °C a 95 °C que permitiu verificar a especificidade dos oligonucleotídeos. Os dados foram pré-analisados por meio do software Step-One Plus versão 2.3™ (Applied Biosystems) e exportados para uma planilha eletrônica. As curvas de amplificação e dissociação geradas pelo sistema foram utilizadas nas análises qualitativas.

2.5. Análise da estabilidade de expressão dos genes de referência candidatos

Os níveis de expressão das amostras para cinco genes candidatos foram avaliados com base no número de ciclos de amplificação necessários para atingir um limite fixo (Limiar de ciclo - Ct) na fase exponencial da PCR. A análise estatística para identificar o número ideal e melhores genes de referência para normalização foi realizada pelo software GenEx versão 7.0™ com auxílio dos algoritmos geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) e Normfinder (ANDERSEN *et al.*, 2004).

O geNorm calcula um valor de estabilidade de expressão (M) para cada gene, em um determinado conjunto de amostras, e os classifica. Quanto mais baixo for o valor M, maior é a estabilidade de expressão. O valor M inferior a 1,5 é recomendado para identificar genes expressos de forma estável.

O NormFinder calcula a estabilidade da expressão do gene para todas as amostras em um determinado número de grupos baseado nas variações intra e inter grupos. Estes valores são combinados para classificar os genes de acordo com a variação de suas expressões. Genes com o menor valor gerado pelo algoritmo são considerados mais estáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Qualidade do RNA Total obtido

Para a análise da expressão gênica se faz necessário que as amostras de RNA total possuam quantidade suficiente, excelente qualidade e, principalmente, integridade. A eletroforese em gel de agarose confirmou a integridade adequada. Bandas ribossomais 28S e 18S mostraram-se nítidas, de modo a evidenciar que não houve degradação durante o processo de extração, purificação e tratamento com DNase I (Invitrogen).

Nas análises espectrofotométricas a razão A260/280 das amostras variaram entre 1,9 e 2,1 o que indica um RNA puro em relação às proteínas. Já os valores de A260/230 variaram entre 1,5 e 1,8 indicando, também, RNA puro em relação aos outros contaminantes (fenol, sais caotrópicos, EDTA, carboidratos, ureia). De modo geral, o RNA apresentou integridade, alta qualidade e boa concentração.

3.2. Qualidade dos oligonucleotídeos

Os ensaios de PCR convencional realizados para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores apresentaram resultados satisfatórios. Todos os oligonucleotídeos amplificaram bandas nítidas e faixa variando entre 75 a 300 pb o que indica não haver produtos inespecíficos ou contaminante de PCR.

3.3. Análise da estabilidade e seleção dos genes de referência

De acordo com as curvas de dissociação, os oligonucleotídeos demonstraram especificidade de reação confirmada pela presença de um pico único na curva.

Com auxílio do geNorm e NormFinder foi avaliada a estabilidade da expressão gênica de cinco candidatos a genes de referência em híbridos de *Eucalyptus* sp. (EUCONS08, EUCONS21, EGIDH, UBQ e IDH).

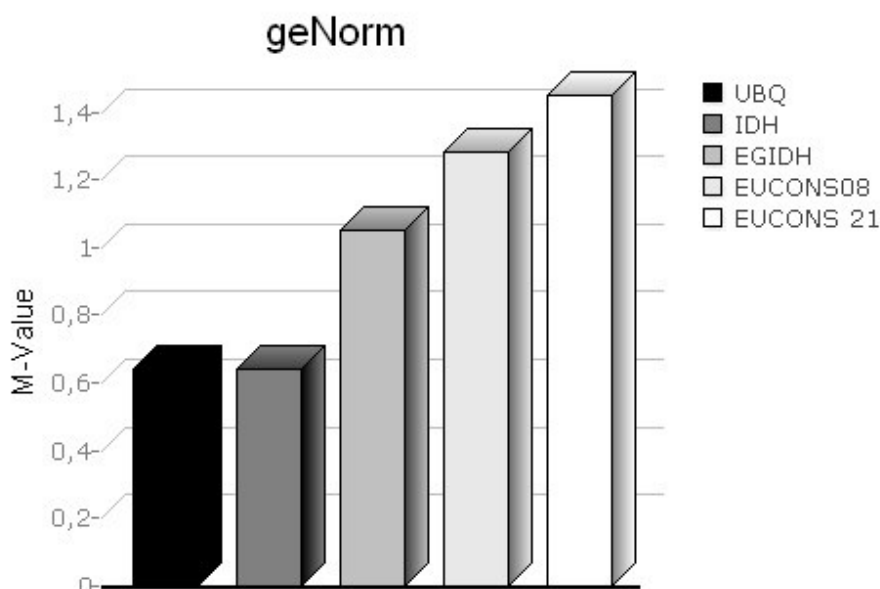
O geNorm classifica os genes de referência com base em seu valor de estabilidade de expressão (M). Valor M mais alto indica o menos estável e o mais baixo o mais estável. O limiar para um gene de referência aceitável é aquele com um valor M inferior a 1,5. A classificação dos cinco candidatos avaliados pelo geNorm encontra-se descrita na Tabela 3 e ilustrada na Figura 1. O valor M para todos os genes candidatos a normalizadores foi inferior a 1,5. Com base na análise do geNorm UBQ e IDH foram considerados a combinação mínima adequada para normalização (Figura 1 e Tabela 3).

Tabela 3 – Classificação de candidatos a genes de referência em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* submetidos a estresses abióticos, de acordo com a estabilidade de expressão, a partir de avaliações realizadas com os algoritmos geNorm e NormFinder. Valor de M : média de estabilidade de expressão.

geNorm			NormFinder		
Posição	Gene	Valor de M	Posição	Gene	Valor de Estabilidade
1º	IDH	0,6411	1º	IDH	0,3850
1º	UBQ	0,6411	2º	UBQ	0,9309
2º	EGIDH	1,0517	3º	EUCONS08	1,1301
3º	EUCONS08	1,2831	4º	EGIDH	1,1406
4º	EUCONS21	1,4497	5º	EUCONS 21	1,4281

Fonte: Próprio autor.

Figura 1 – Valor M calculado pelo programa geNorm para os cinco genes candidatos a genes de referência.



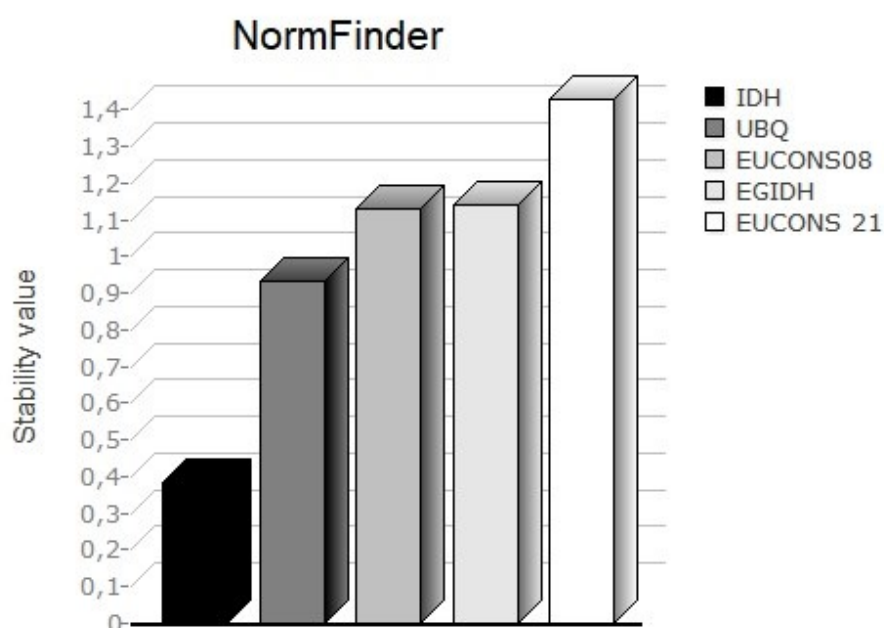
Fonte: Próprio autor.

O NormFinder usa um modelo matemático diferente do geNorm e leva em consideração a variação intragrupo e intergrupo. Além disso, calcula um valor de estabilidade para cada gene de referência. Os mais estáveis são aqueles com a menor variação inter e intragrupo e têm o menor valor de estabilidade. A classificação dos genes de referência pelo NormFinder encontra-se descrita na Tabela 3 e ilustrada na Figura 2. A inspeção manual dos

dados sugere que o gene IDH é o mais estável seguido do UBQ, o que corrobora com o resultado do geNorm.

Ambos os algoritmos produziram resultados semelhantes, porém, não idênticos. A posição do EGIDH e EUCONS08 foi invertida. No geNorm o EGIDH é mais estável que o EUCONS08 e no NormFinder o EUCONS08 é mais estável que o EGIDH, não obstante, a diferença numérica é pequena. Em ambos, o EUCONS21 foi o menos estável. De modo geral, houve pouca variação entre as duas ferramentas.

Figura 2 – Estabilidade de expressão calculada pelo programa NormFinder para os cinco genes candidatos a genes de referência.



Fonte: Próprio autor.

A seleção dos cinco candidatos a genes de controle interno foi baseada na citação em outras abordagens da literatura que envolviam a técnica de RT-qPCR. Cada gene possui distintos papéis relacionados às funções de manutenção em células vegetais. Alguns estudos também verificaram o UBQ e IDH como genes mais estáveis, todavia, em outras condições.

Moura *et al.* (2012), selecionaram nove genes para avaliar a estabilidade sob diferentes condições de estresse com espécies de *Eucalyptus* sp., dos quais cinco foram considerados estáveis (IDH, SAND, ACT, A-Tub e UBQ). Estes autores propuseram que o IDH e pelo menos mais dois dos cinco genes fossem utilizados, já que, o uso de mais de um é preferível para minimizar erros na estimativa da expressão. Por outro lado, Martins *et al.* (2018) realizaram estudo com híbridos de *Eucalyptus camaldulenses* x *Eucalyptus urophylla* sob condições de seca e irrigação. A estabilidade de sete candidatos foi avaliada (UBQ, SAND,

PP2A-3, PP2A-1, IDH, TUB, EF1 α). A variação de estabilidade foi presente em todos os conjuntos amostrais. Entretanto, os genes SAND e PP2A-3 apresentaram maior estabilidade nas análises. Logo, foram considerados os mais adequados para normalização dos dados. Oliveira *et al.* (2012) selecionou 50 genes para estudo sobre a estabilidade da expressão gênica em tecidos de seis espécies de eucalipto. Desses 50, oito foram escolhidos juntamente com outros sete genes já testados, disponíveis na literatura. Entre os utilizados se encontravam os genes EUCONS08 e EUCONS21. Os melhores resultados foram obtidos para ambos, juntamente com o EUCONS04.

As variações observadas entre os dados obtidos no nosso estudo e nos demais relatados pode ser reflexo das diferentes espécies e distintas condições experimentais. Isso evidencia a importância de não se basear apenas na literatura para seleção dos genes, sendo, necessário, testes específicos de estabilidade dos candidatos para cada distinto experimento. De tal maneira, será realizada uma normalização adequada com posterior obtenção de quantificação precisa e confiável nos níveis de expressão dos genes alvos.

4. CONCLUSÃO

Os genes IDH e UBQ demonstraram ser os mais adequados para normalização dos resultados da RT-qPCR em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* sob condição de distúrbio fisiológico. Estes, possuem maior estabilidade de expressão detectada em unanimidade nas análises. Não são necessários mais de dois genes para normalização sob esta condição experimental. Uma seleção adequada de genes de controle interno ajuda a minimizar imprecisões e evita interpretação incorreta dos dados. Portanto, o par selecionado irá fornecer uma normalização precisa e confiável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

BUSTIN, S. A. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

HAZEN, S. P.; WU, Y.; KREPS, J. A. Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. **Functional & Integrative Genomics**, v. 3, n. 3, p. 105-111, 2003.

MARTINS, G. S. *et al.* Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 229, p. 122-131, 2018.

MOURA, J. C. M. S. *et al.* Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

NAVARRO, E. *et al.* Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231-250, 2015.

OLIVEIRA, L. A. de *et al.* Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 2, p. 405-422, 2012.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

WAN, Q. *et al.* Stability evaluation of reference genes for gene expression analysis by RT-qPCR in soybean under different conditions. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0189405, 2017.

ARTIGO 2: EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM HÍBRIDOS DE *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* AFETADOS POR DISTÚRBIO FISIOLÓGICO

RESUMO

Condições ambientais adversas limitam o desenvolvimento, crescimento e produtividade de espécies florestais. A interação do ambiente com o genoma pode ocasionar doença abiótica genericamente chamada de distúrbio fisiológico, que, afeta o metabolismo celular e ocasiona expressão gênica diferencial. Por meio de estudos da expressão gênica é possível identificar genes cuja expressão tenha sido modificada nas células, podendo assim serem caracterizados como importantes marcadores genéticos associados a fenômeno biológico. O intuito do estudo foi detectar alterações na expressão gênica em clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* afetados por distúrbio fisiológico. Para isso, foram analisados 33 genes envolvidos em diversos estresses abióticos de plantas, a partir de um conjunto limitado de genes selecionados usando técnica RT-qPCR em tecidos foliares com e sem sintomas. Dos 33 genes alvos, seis foram selecionados para apresentação e discussão dos resultados (CDPK26, CIPK, WRKY4, CDPK11, MYB e AQUAPORINA TIP2-1). As análises estatísticas foram realizadas por meio do uso do programa GenEx versão 7.0TM da empresa MultiD Analysis. Todos os seis genes estudados apresentaram expressão gênica diferencial entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Os resultados sugerem que o aumento da expressão dos genes no material doente pode estar associado a resposta da planta aos estresses abióticos ocorridos no local, sugerindo possível relação entre o distúrbio e as condições adversas do meio.

Palavras-chave: Estresses Abióticos; Distúrbios Fisiológicos; *Eucalyptus* sp.; Expressão Gênica; RT-qPCR.

ABSTRACT

Adverse environmental conditions limit the development, growth and productivity of forest species. The interaction of the environment with the genome can cause abiotic disease generically called physiological disorder, which affects cellular metabolism and causes differential gene expression. Through gene expression studies, it is possible to identify genes whose expression has been modified in cells, which can be characterized as important genetic markers associated with biological phenomena. The aim of the study was to detect changes in gene expression in hybrid clones of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* affected by physiological disorder. To this end, 33 genes involved in various abiotic plant stresses were analyzed, from a limited set of genes selected by the RT-qPCR technique in leaf tissues with and without symptoms. Of the 33 target genes, six were selected for presentation and discussion of results (CDPK26, CIPK, WRKY4, CDPK11, MYB and AQUAPORINA TIP2-1). Statistical analyzes were performed using the GenEx version 7.0TM program from the company Análise MultiD. All six genes studied showed differential gene expression between symptomatic and asymptomatic individuals. The results obtained showed that the increase in gene expression in the diseased material may be associated with the plant's response to abiotic stresses occurring at the site, suggesting a possible relationship between the disorder and adverse environmental conditions.

Keywords: Abiotic Stresses; Physiological Disorders; *Eucalyptus* sp.; Gene expression; RT-qPCR.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* sp. destaca-se como sendo o mais plantado no mundo. Os maiores produtores são Índia, Brasil, África do Sul, Portugal, Espanha, China, Uruguai e Chile (FONSECA *et al.*, 2010). É extensivamente utilizado em plantios florestais devido inúmeros fatores, tais como rápido crescimento, versatilidade de propagação, fácil adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas, alta produtividade, dentre outros. Essas boas características foram, em grande parte, fruto de melhoramento genético e técnicas de manejo adequadas (ABRAF, 2013). A eucaliptocultura possui contribuição importante na economia brasileira, pois, fornece matéria-prima, produtos para a exportação, gera impostos e empregos, além de auxiliar de maneira direta na esfera ambiental, aliviando a pressão sobre a vegetação nativa remanescente.

Todavia, apesar dos diversos benefícios, as plantas desse gênero não deixam de ser afetadas por condições ambientais adversas que limitam desenvolvimento, crescimento e produtividade. Devido inúmeros fatores, tais como a luminosidade, intensidade de luz ultravioleta, temperatura, condição hídrica, salinidade e exposição a metais pesados, uma amplitude de estresses abióticos pode ocorrer (HE; HE; DING, 2018). Mas, nem todos os genótipos sofrem com esses fatores adversos, uma vez que, muitos são resistentes ou tolerantes. Tolerância, resistência ou suscetibilidade são fenômenos complexos devido a possibilidade de estresses acontecerem em múltiplos estádios do desenvolvimento da planta e, frequentemente, mais de um tipo simultaneamente. A percepção e transdução de sinal para ativar respostas adaptativas são etapas críticas na determinação da sobrevivência e reprodução das plantas. O sinal é primeiramente percebido na membrana plasmática por receptores e, posteriormente, transmitido para o interior da célula, que pode resultar na ativação de genes estresse-responsivos (CHINNUSAMY; SCHUMAKER; ZHU, 2004).

A interação entre ambiente e genoma pode ocasionar doença abiótica, genericamente chamada de distúrbio fisiológico, que afeta o metabolismo celular e ocasiona expressão gênica diferencial no indivíduo, alterando características fenotípicas normais da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os efeitos oriundos do distúrbio fisiológico representam grande entrave à produtividade e proporciona considerável prejuízo econômico e ambiental. Dentro dessa conjuntura, um melhor entendimento sobre a influência da doença abiótica no comportamento morfológico, fisiológico e genético molecular do eucalipto é de suma importância. Por meio de estudos da expressão gênica é possível caracterizar os genes nas

células cuja expressão gênica foi alterada. Esses transcritos podem suscitar informações relevantes e indicar as causas de ocorrência desses estresses ou distúrbio fisiológico.

Com a identificação e caracterização de genes regulados por estresses é possível entender melhor a fisiologia da planta, o funcionamento de mecanismos de tolerância e prover uma base de estratégias eficientes para os programas de melhoramento genético de plantas de modo a elevar a tolerância dos híbridos de *Eucalyptus* sp. sob condições adversas de estresse.

Em maio de 2007, plantios florestais brasileiros com híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* localizados no sul do estado da Bahia apresentaram anomalias no crescimento. Verificou-se que os sintomas observados podem estar relacionados com algum distúrbio fisiológico devido interação de 4 fatores previamente analisados (genético, edáfico, nutricional e climático). Ou seja, a interação entre o genoma e as condições do meio pode ter desencadeado alterações quanto a expressão gênica dos indivíduos de modo a provocar expressão gênica diferencial. Os sintomas foram descritos como desordem que compromete o crescimento e a produtividade das árvores, causando perdas significativas, podendo gerar a morte de árvores isoladas ou em grande quantidade.

Em face ao exposto, este estudo teve como objetivo identificar possíveis genes responsivos pelo distúrbio fisiológico em clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* por meio da técnica da PCR Quantitativa em Tempo Real de Transcrição Reversa (RT-qPCR).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF), localizado no Departamento de Engenharia Florestal e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, localizado no Centro Integrado de Pesquisa e Pós-Graduação em Saúde (CIPq-Saúde) no Campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, MG.

2.1. Material Vegetal

Foram coletadas amostras de três genótipos distintos em dois ambientes diferentes (Tabela 1).

Tabela 1 – Características dos ambientes de coleta e dos materiais genéticos (clones) de eucalipto analisados por meio da técnica de RT-qPCR. PAd2.1 - Argissolo Amarelo; LAdx2.1 - Latossolo amarelo; Dup. = duplicata biológica (árvores diferentes de um mesmo clone); Rep. = replicata (amostras diferentes de uma mesma árvore); Amb. = ambiente; UMO - Unidade de Manejo Operacional; E. = espaçamento.

<i>Pool</i> (Clone)	Dup.	Rep.	Estado				Amb.	Fisiológico	Projeto	Talhão	Data de Plantio	UMO	Unidade de solo	Município	E. (m)	Precipitação Média Anual (mm)	Genótipo	Coordenadas Geográficas
1004	A1.1	A1.1.1	A1.1.2	A1.1.3	A1	Com sintomas	Boleira	013-01	11/09/2007	1	PAd2.1	Porto Seguro	4,00	1.400	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> <i>urophylla</i>	16°41'01"S/3 9°22'31"W		
	A1.2	A1.2.1	A1.2.2	A1.2.3									x					
	A1.3	A1.3.1	A1.3.2	A1.3.3									3,00					
1004	A2.1	A2.1.1	A2.1.2	A2.1.3	A1	Sem sintomas	Jambeiro III	061-01	15/06/2011	1	PAd2.1	Porto Seguro	5,00	1.350	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> <i>urophylla</i>	16°34'38"S/3 9°25'40"W		
	A2.2	A2.2.1	A2.2.2	A2.2.3									x					
	A2.3	A2.3.1	A2.3.2	A2.3.3									2,40					
1004	A3.1	A3.1.1	A3.1.2	A3.1.3	A2	Sem sintomas	Gameleira	041-01	24/01/2011	4	LAdx2.1	Itabela	5,00	1.300	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> <i>urophylla</i>	16°42'27"S/3 9°36'22"W		
	A3.2	A3.2.1	A3.2.2	A3.2.3									x					
	A3.3	A3.3.1	A3.3.2	A3.3.3									2,40					
361	A4.1	A4.1.1	A4.1.2	A4.1.3	A1	Com sintomas	Boleira	012-01	17/09/2007	1	PAd2.1	Porto Seguro	4,00	1.400	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> <i>urophylla</i>	16°41'02"S/3 9°22'31"W		
	A4.2	A4.2.1	A4.2.2	A4.2.3									x					
	A4.3	A4.3.1	A4.3.2	A4.3.3									3,00					
975	A5.1	A5.1.1	A5.1.2	A5.1.3	A1	Sem sintomas	Boleira	003-01	17/09/2007	1	PAd2.1	Porto Seguro	4,00	1.400	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> <i>urophylla</i>	16°41'43"S/3 9°23'35"W		
	A5.2	A5.2.1	A5.1.2.2	A5.2.3									x					
	A5.3	A5.3.1	A5.3.2	A5.3.3									3,00					

Fonte: Próprio autor

A coleta do tecido foliar com e sem sintomas foi efetuada em áreas de plantio de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com ocorrência de distúrbio fisiológico. O plantio é pertencente a uma Empresa Florestal brasileira localizada sul do Estado da Bahia.

Por meio de amostragem aleatória simples foram selecionadas três árvores com sintomas e três árvores sem sintomas e os tecidos foliares foram coletados em triplicata. As amostras de tecido permaneceram acondicionadas em recipiente com nitrogênio líquido e, posteriormente, foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento da extração do RNA Total.

2.2.RNA Total

As amostras foliares (aproximadamente 100 mg) foram submetidas à maceração mecânica com o uso do disruptor Mini Beadbeater™ (Biospec Products) em tubos de polietileno de 2,0 mL resfriados em nitrogênio líquido com 3 esferas de aço inoxidável de 3,2 mm de diâmetro. Com o auxílio do conjunto de reagentes RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) e conforme instruções do fabricante, o RNA total foi extraído e purificado. Para remover contaminantes de DNA genômico, as amostras foram digeridas com DNase I (Invitrogen).

A integridade do ácido nucleico foi avaliada por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. O critério de avaliação foi verificar a conservação relativa das frações do RNA ribossômico 28S e 18S. O rendimento e grau de pureza foram assegurados pelo espectrofotômetro (Lamba Bio - PerkinElmer), em que, amostras são avaliadas pelos comprimentos de onda (λ) 260, 280 e 230. Uma amostra é considerada de boa qualidade quando a razão $\lambda_{260}/280$ equivale a 1,8 - 2,0 e a razão $\lambda_{260}/230$ equivale a 2,0 - 2,2. As amostras também foram analisadas por meio do fluorômetro Qubit 3 (Invitrogen).

2.3.Seleção dos genes de referência para normalização dos dados

A análise de RT-qPCR requer diversas padronizações para uma quantificação precisa e confiável dos níveis de expressão dos genes alvos. A normalização dos resultados por meio de genes de controle interno corrige as variabilidades inerentes ao RNA no processo experimental. Logo, a partir de dados prévios disponíveis na literatura foram selecionados cinco candidatos a genes de referência: EUCONS08, EUCONS21, IDH, EGIDH e UBQ.

Em estudo anterior, a estabilidade dos cinco foi analisada na condição experimental em questão por meio do software GenEx versão 7.0 com os algoritmos geNorm e Normfinder. Os genes IDH e UBQ foram os mais estáveis sendo utilizados nesse estudo. As sequências, tamanhos e amplicons dos dois oligonucleotídeos selecionados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Genes de referência cuja estabilidade da expressão gênica foi testada para utilização na normalização dos genes GOI. Oligonucleotídeos direto (F) e reverso (R), tamanho de cada oligonucleotídeo em bases (b), tamanho do amplicon em pares de bases (pb) e número de acesso do mRNA do respectivo gene depositado no GenBank (GI).

Genes de Referência	Sequencia dos primers	Tamanho (b)	Amplicon (pb)	GI
IDH	F - AGTTTGAGGCTGCTGGAATC	20	100	XM_010064015
	R - CTTGCATGCCCACACATAAC	20		
UBQ	F - GAGGGACATCTATCTCTATGAC	22	131	XM_010071338
	R - CAACAGTAAGCACACGAG	18		

Fonte: Próprio autor.

2.4. Seleção dos genes de Interesse (GOI)

Com base na literatura, 33 genes envolvidos em respostas a diversos estresses abióticos em plantas foram selecionados (Tabela 3). As sequências de nucleotídeos desses genes foram recuperadas a partir do GenBank (BENSON *et al.*, 2015) e utilizadas no projeto Phytozome (GOODSTEIN *et al.*, 2012) como “iscas” a fim de verificar se o genoma do *Eucalyptus grandis* (BRASUZ1) (MYBURG *et al.*, 2014) tinha algum ortólogo dos mesmos. Uma vez recuperada a sequência de nucleotídeos do ortólogo (mRNA) presente no genoma do BRASUZ1, esta foi utilizada como molde para a produção dos oligonucleotídeos iniciadores. Com o auxílio do programa Primer3Plus versão 2.3.6 (UNTERGASSER *et al.*, 2012) ajustado para produzir iniciadores para reações qPCR, um par de oligonucleotídeos para cada um dos genes de interesse foi produzido. As principais características desses iniciadores foram: tamanho do *amplicon* entre 70 e 200 pb; tamanho do oligonucleotídeo entre 18 e 23 bases; temperatura de desnaturação entre 58 e 62 °C, com uma diferença mínima entre os dois iniciadores de um mesmo par não superior a 3 °C; e não ocorrer dímeros entre eles. Por fim, após obtenção das sequências de cada um dos pares de iniciadores, as mesmas foram submetidas a análise de similaridade no GenBank, por meio da ferramenta BLASTN, a fim de verificar se aquele par era específico para um único gene da espécie estudada. Todos esses oligonucleotídeos foram submetidos a PCR convencional para avaliar a especificidade dos mesmos a partir de molde de DNA extraído das mesmas amostras.

Tabela 3 – Genes candidatos selecionados para averiguar se a respectiva expressão está associada à ocorrência da anomalia fisiológica de causa desconhecida que vem ocorrendo em *Eucalyptus*.

(continua)

Gene-Alvo	Função	Referências
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) é uma família altamente conservada de proteínas cinases de serina/treonina envolvidas numa variedade de processos celulares fundamentais, tais como a proliferação, diferenciação, motilidade, resposta ao estresse, apoptose e sobrevivência.	ICHIMURA <i>et al.</i> , 2002; RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2010.
bHLH	Os fatores de transcrição (TFs) básicos da hélice-alça-hélice (bHLH) da planta estão envolvidos em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo a regulação das respostas das plantas a vários estresses abióticos.	HUANG <i>et al.</i> , 2013; DONG <i>et al.</i> , 2014.
SAP	Proteínas associadas ao estresse (SAP) desempenham um papel na aquisição de tolerância a alguns estresses abióticos.	CHARRIER <i>et al.</i> , 2013.
SAUR	São os primeiros genes responsivos a auxina representados por uma grande família multigênica em plantas. Estudos recentes propuseram que as proteínas SAUR são capazes de modular o transporte de auxina e a expansão celular por um mecanismo desconhecido. Proteínas SAUR podem servir como moléculas de sinalização para a coordenação da proliferação e expansão celular.	QIU <i>et al.</i> , 2013; CHEN; HAO; CAO, 2014.
CaM	Diversos membros de proteínas CaM em diferentes espécies estão envolvidas com respostas aos estresses abióticos, por exemplo, a superexpressão do gene CaM4 de <i>Glycynemax</i> aumentou a tolerância de plantas de soja ao estresse salino.	RAO <i>et al.</i> , 2014.
CDPK26	O gene EgrCPK26 está relacionado com a abertura e fechamento estomático através da ativação dos canais iônicos de Ca ²⁺ , regulando consequentemente a perda de água e a assimilação de carbono.	MARTINS <i>et al.</i> 2018.
CIPK	Membros dessa família desempenham papéis importantes nos processos de desenvolvimento da planta, transdução de sinalização de hormônios, na regulação da homeostase dos íons vegetais e na resposta ao estresse abiótico. CIPKs ativados podem subsequentemente transduzir sinais de cálcio por fosforilação dos componentes de sinalização a jusante.	HASHIMOTO <i>et al.</i> , 2012.
WRKY	Possuem papéis regulatórios importantes na defesa contra estresses bióticos e abióticos, como ataques de vírus, fungos e bactérias patogênicas, estresse térmico, deficiência de nutrientes, estresse salino, frio, UV-B e deficit hídrico.	YANG, <i>et al.</i> , 2018.
Tify (ZIM)	As proteínas TIFY constituem uma superfamília específica da planta e estão envolvidas na regulação de muitos processos da planta, como desenvolvimento, defesas e respostas ao estresse.	EBEL <i>et al.</i> , 2018.
CDPK11	A proteína quinase dependente de cálcio 11 (CDPK11) é um importante regulador positivo nas vias de sinalização ABA mediadas por CDPK/cálcio. Ela controla positivamente a regulação estomática e mantém o equilíbrio hídrico da planta sob condições de estresse abiótico.	ZHU <i>et al.</i> , 2007.
LEA	Estão envolvidos na proteção de plantas superiores contra danos causados por estresses ambiental, especialmente a seca (desidratação).	HONG-BO; ZONG-SUO; MING-AN, 2005.
BOR2	O BOR2 codifica um transportador de efluxo B localizado na membrana plasmática e é fortemente expresso nas capas laterais das raízes e na epiderme das zonas de alongamento das raízes.	MIWA <i>et al.</i> , 2013.
ERF (AP2/ERF)	Os fatores de transcrição da família AP2 / ERF, por meio de conversas cruzadas, são susceptíveis de regular as respostas de desenvolvimento, fisiológicas e bioquímicas das plantas a uma variedade de condições de estresse ambiental, incluindo aqueles que ocorrem em combinação com outros estresses abióticos e bióticos.	MIZOI; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012.
CBF/DREB	Constituem um grande grupo de fatores de transcrição que possuem papel em estresses abióticos como a seca, salinidade e tolerância a baixas temperaturas em plantas.	ALI; HADI, 2018.
DREB 2C	Está envolvido na indução da expressão de genes em resposta a estresses osmótico e frio.	YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2009.

(continuação)

Gene-Alvo	Função	Referências
SAMDC	Codifica a enzima-chave da via biossintética das poliaminas, associadas ao crescimento e diferenciação das plantas e à manutenção do metabolismo sob condições de estresse hídrico.	ANDRADE, 2010.
HD-ZIP (ATHB, HAT)	As proteínas HD-ZIP participam de uma variedade de processos durante o crescimento e desenvolvimento da planta. As proteínas HD-Zip I estão geralmente envolvidas em respostas relacionadas ao estresse abiótico, ácido abscísico (ABA), luz azul, desestiolação e embriogênese. As proteínas HD-Zip II participam da resposta à luz, evasão de sombra e sinalização de auxina. Os membros do terceiro grupo (HD-ZipIII) controlam a embriogênese, a polaridade da folha, a iniciação lateral do órgão e a função do meristema.	ELHITI; STASOLLA, 2009.
MYB	A superfamília do fator de transcrição MYB é uma grande família de genes que desempenha papéis centrais nos processos de desenvolvimento e respostas de defesa em plantas. Esses genes regulam a diferenciação celular, formação de órgãos, morfogênese foliar, metabolismo secundário e respostas ao estresse abiótico.	AMBAWAT <i>et al.</i> , 2013.
CBL	Em plantas, proteínas semelhantes à calcineurina B (CBLs) desempenham papéis cruciais na regulação da sinalização de cálcio em resposta a vários estresses abióticos, interagindo com proteínas quinases específicas de interação com CBL (CIPKs).	ZHANG <i>et al.</i> , 2016.
JAZ	Medeiam as respostas das plantas ao ataque de insetos, feridas, infecção de patógenos, estresse e danos UV e regulam a fertilidade da planta, o acúmulo de antocianinas, a formação de tricomas e muitos outros processos de desenvolvimento da planta.	QI <i>et al.</i> , 2011.
PYL4	Receptor requerido para as respostas mediadas pelo de ácido abscísico (ABA), como fechamento dos estômatos e inibição da germinação. Inibe a atividade do grupo A da proteína fosfatase tipo 2C (PP2Cs) quando ativados pelo ABA.	PIZZIO <i>et al.</i> , 2013.
NCED	Estudos bioquímicos e genéticos sugerem que a 9- cis- epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) é a enzima chave na via biossintética do ABA nas plantas.	ZHANG <i>et al.</i> , 2009.
NAC	Numerosas proteínas de domínio NAC são implicadas em estresses abióticos e respostas de defesa nas plantas, tais como seca, salinidade, choque frio, ferimento mecânico e infecção viral.	HU <i>et al.</i> , 2010.
NPR1	Expressão de NPR1 é induzida pela infecção de patógenos ou tratamento com compostos indutores de defesa, como o ácido salicílico (SA).	YU; CHEN; CHEN, 2001.
GTP47	Estão diretamente envolvidos nas respostas das plantas ao NaCl e são necessários para a tolerância ao estresse salino.	SWEETMAN <i>et al.</i> , 2020.
PAE2	Os PAEs desempenham um papel significativo na modulação do estado de acetilação dos polímeros pécicos na parede, destacando a importância do metabolismo apoplástico para a célula vegetal e o crescimento da planta.	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2014.
GTP8	Estão diretamente envolvidos nas respostas das plantas ao NaCl e são necessários para a tolerância ao estresse salino.	SWEETMAN <i>et al.</i> , 2020.
BOR5	São responsáveis pela captação eficiente de B pelas raízes, carregamento e distribuição de B nas plantas.	TAKANO <i>et al.</i> , 2002.
CYP	Os CYPs têm uma função chave para gerar a diversidade química que é a marca registrada das plantas em comparação com os animais.	NELSON; WERCK-REICHHART, 2011.
HSP	As proteínas de choque térmico (HSPs) funcionam como acompanhantes moleculares. Essas proteínas são codificadas por uma família multigênica cujos membros desempenham papéis cruciais no crescimento, desenvolvimento e resposta ao estresse das plantas.	CHEN <i>et al.</i> , 2018.
DREBP 1A	Expressão de genes DREB1A e seus dois homólogos são induzidos por estresses causados por baixas temperaturas.	WIKIGENES
AQUAPORINA	Aquaporinas (AQPs) são canais de membrana implicados na transferência de água e pequenos solutos através das membranas celulares. Possuem papéis importantes em vários processos fisiológicos das plantas, incluindo crescimento, desenvolvimento e adaptação ao estresse	MAUREL <i>et al.</i> , 2015.
PROLINA	Glicina betaína (GB) e prolina são dois osmólitos orgânicos principais que se acumulam em uma variedade de espécies de plantas em resposta a estresses ambientais, como seca, salinidade, temperaturas extremas, radiação ultravioleta e metais pesados.	ASHRAF; FOOLAD, 2007.

2.5. Ensaio da RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram efetuadas no equipamento StepOne™ RealTime PCR System (Applied Biosystems) com o conjunto de reagentes EXPRESS-One Step SYBR GreenER Kit™, with premixed ROX (Invitrogen). Os reagentes produzem o cDNA e realizam a quantificação do transcrito em uma única reação, em um único tubo. O ensaio contou com três réplicas biológicas (RNA total extraído de três plantas diferentes) e cada réplica biológica contou com duas réplicas técnicas. Foram incluídos controles negativos em que o RNA foi substituído pelo mesmo volume de água de modo a confirmar a especificidade do procedimento. Os procedimentos seguiram as sugestões do fabricante do equipamento e do conjunto de reagentes, com algumas modificações. O volume da reação foi de 10 µl e consistiu em 2,0 µl de RNA, 0,75 µl de água livre de endonucleases (Ambion®), 1 µl do iniciador direto, 1 µl do iniciador reverso, 0,25 µl do SYBR® Green PCR Superscript mix e 5,00 µl do SYBR® Green PCR Supermix with Rox. O passo para produção do cDNA foi realizado com um ciclo de 45 °C por 30 min e um de 95 °C por 10 min. Em seguida, as amostras foram submetidas a 40 ciclos a 95 °C por 15 s seguido por 65 °C por 1 min e 15 s. Ao final de cada reação foi gerada uma curva de dissociação de 60 °C a 95 °C que permitiu verificar a especificidade dos oligonucleotídeos. Os dados foram pré-analisados por meio do software Step-One Plus versão 2.3™ (Applied Biosystems) e exportados para uma planilha eletrônica. As curvas de amplificação e dissociação geradas pelo sistema foram utilizadas nas análises qualitativas.

2.6. Análise da expressão gênica diferencial

Os níveis de expressão foram avaliados com base no número de ciclos de amplificação necessários para atingir um limiar fixo (limiar de ciclo – Cq) na fase exponencial da PCR. A partir dos valores de Cq obtidos, os níveis de expressão gênica das amostras foram mensurados utilizando o cálculo da quantificação relativa.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do uso do programa GenEx versão 7.0™ da empresa MultiD Analysis. A média das réplicas técnicas foi utilizada nas análises. As quantidades relativas foram calculadas em função do menor valor de expressão e, então, convertidos para a escala log2. Na sequência, os valores foram normalizados em função da expressão de genes endógenos e o erro padrão da média foi calculado para cada um dos conjuntos “sem sintomas” e “com sintomas”. Por fim, os resultados foram apresentados em forma gráfica para possibilitar a comparação da expressão gênica entre os tratamentos.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. RNA Total

Para a análise da expressão gênica se faz necessário que as amostras de RNA total possuam integridade, quantidade suficiente e excelente qualidade. A eletroforese em gel de agarose confirmou a integridade adequada. Bandas ribossomais 28S e 18S mostraram-se nítidas, de modo a evidenciar que não houve degradação durante todo o processo de extração, purificação e tratamento com DNase.

Nas análises espectrofotométricas a razão A260/280 das amostras variaram entre 1,9 e 2,1 o que indica um RNA puro em relação a proteínas. Já os valores de A260/230 variaram entre 1,5 e 1,8 indicando, também, RNA puro em relação a outros contaminantes (fenol, sais caotrópicos, EDTA, carboidratos, ureia). De modo geral, o RNA apresentou integridade, alta qualidade e boa concentração.

3.2. Análise da expressão gênica diferencial

Relatos fornecidos pelos responsáveis das áreas de plantio afirmam que há interações intra e inter-clonal entre os indivíduos. Ou seja, um mesmo material genético possui comportamento diferente em ambientes distintos e em um mesmo ambiente há comportamento distinto entre os clones. Diante do exposto, de modo a verificar se as diferenças de resposta aos estresses são ocasionadas apenas pelo ambiente, unicamente pelo genótipo, ou, por determinada interação entre eles, os indivíduos de um mesmo genótipo afetados e não afetados foram avaliados dentro de um mesmo ambiente e em ambientes diferentes. Além disso, genótipos que sempre apresentaram sintomatologia e genótipos que nunca apresentaram sintomas, independente do ambiente, foram comparados entre si em um mesmo ambiente.

Os níveis de expressão das amostras foram avaliados com base no número de ciclos de amplificação necessários para atingir um limite fixo (Limiar de ciclo - Ct) na fase exponencial da PCR. Foi observada presença de picos únicos nas análises das curvas de dissociação o que indica que não houve formação de dímeros e confirma a especificidade dos produtos amplificados.

Nas análises, a condição 1004-A1-SS (genótipo 1004 no ambiente 1, sem sintomas) foi colocada como uma forma padrão de comparação. O clone 1004 apresenta-se com e sem sintomas no ambiente 1 e sem sintomas no ambiente 2. Além disso, dois clones distintos 361 e

975 foram comparados em um mesmo ambiente (A1). Os resultados da RT-qPCR são descritos na forma de média e desvio-padrão dos valores do ciclo de quantificação (Cq). Assim, os genes testados mostraram diferentes níveis de expressão nas amostras analisadas, conforme determinado pelo Cq.

Foram analisados 33 genes alvos e cinco candidatos a genes endógenos, dos quais 2 previamente selecionados com base nos dados descritos no capítulo 1. Dos 33 genes alvos, seis foram selecionados para apresentação e discussão dos resultados (CDPK26, CIPK, WRKY4, CDPK11, MYB e AQUAPORINA TIP2-1) (Tabela 4).

Tabela 4 – Genes de interesse GOI cuja expressão gênica foi analisada. Oligonucleotídeos direto (F) e reverso (R), tamanho de cada oligonucleotídeo em bases (b), tamanho do amplicon em pares de bases (pb) e número de acesso do mRNA do respectivo gene depositado no GenBank (GI).

Genes de Interesse	Sequencia dos primers	Tamanho (b)	Amplicon (pb)	GI
<i>CDPK26</i>	F- GCATTCACGTGCAAGTCATC	20	72	XM_010055039
	R- CCCCTCAATTGAAGATGTGG	20		
<i>CDPK11</i>	F- CAGTGGCAGCATAACATTTCG	20	141	XM_010063698
	R- GCGAGAAATTCGCCATAGTC	20		
<i>WRKY4</i>	F- TGGGCAGAAACAGGTTAAGG	20	108	XM_010046160
	R- ATATGGCCGTCAAGAGAACG	20		
<i>CIPK</i>	F- TTTGGAACGGAAGGAGACAG	20	125	XM_010051144
	R- TCTTGTACGCGCAAAGTCTG	20		
<i>MYB</i>	F-TCTTGTGCTGGAACAACCAG	20	90	XM_010045792
	R- TCCCACGAAATGGTCCTAAG	20		
<i>AQUAPORINA TIP2;1</i>	F- CAATCCAGCTGTCACTTTTCG	20	117	XM_010064206
	R- ACTTTGAGGAGCAAGCAAGC	20		

Fonte: Próprio autor

Os demais 27 falharam em algum quesito importante para as análises RT-qPCR ou não apresentaram diferenças significativas entre as condições (com ou sem sintomas) ou entre clones e foram descartados, o que é normal em se tratando de estudo de expressão gênica.

3.3. Genes de Interesse

O Ca^{2+} é reconhecido como principal mediador em respostas imunológicas das plantas. É um componente essencial da sinalização na célula guarda e regula os fluxos de íons envolvidos nos movimentos estomáticos, principalmente por meio da fosforilação de canais dependente de CDPK (calcium-dependent protein kinase) (BOUDSOCQ; SHEEN, 2013). A regulação de seus níveis constitui estratégia importante contra a deficiência de água. Alterações induzidas nas concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} , posteriores a percepção de estresse, são reconhecidas por proteínas de ligação de cálcio, que, por sua vez, transmitem a informação a

jusante para iniciar uma cascata de fosforilação levando à regulação da expressão gênica (KUDLA; BATISTIČ; HASHIMOTO, 2010).

Genes da família multigênica das proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} desempenham uma série de funções nas plantas, como a sinalização de estresse ambiental após a percepção de estímulos de estresse abiótico. Eles são sensores/ transdutores de Ca^{2+} versáteis e evolutivamente conservados que participam da ativação e inibição de uma variedade de enzimas, canais iônicos e fatores de transcrição (MARTINS *et al.*, 2018).

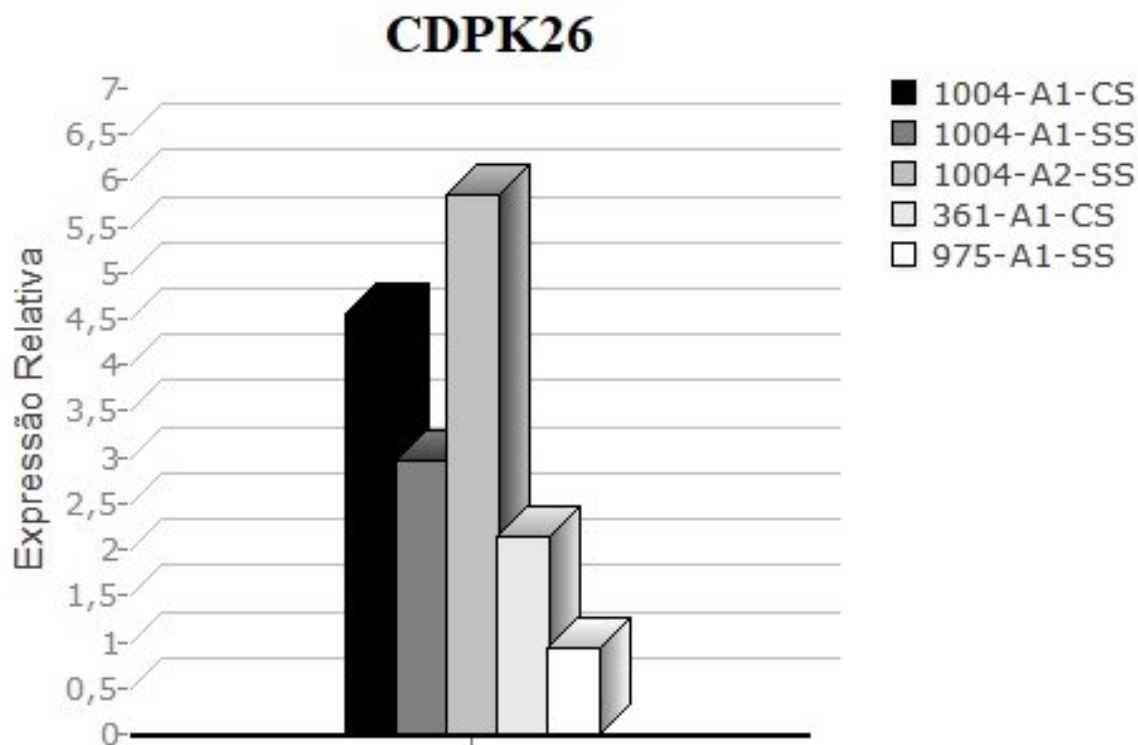
O gene EgrCPK26 (*Eucalyptus* sp. calcium-dependent protein kinase 26) está relacionado com a abertura e fechamento estomático por meio da ativação dos canais iônicos de Ca^{2+} , regulando consequentemente a perda de água e a assimilação de carbono (MARTINS *et al.* 2018). O AtCPK26 (*Arabidopsis thaliana* calcium-dependent protein kinase 26) é outro homólogo ao gene estudado e participa de alterações dos canais iônicos, principalmente nas células guarda, atuando na abertura e fechamento estomático e em outras funções fisiológicas na tolerância a seca (XU *et al.*, 2010).

Martins *et al.* (2018) avaliaram as expressões de genes que codificam para proteínas associadas com respostas de tolerância à seca, dentre eles, a proteína quinase dependente de cálcio 26 do *Eucalyptus* sp. (EgrCDPK26). As análises foram feitas por RT-qPCR em amostras de folhas de clones sensíveis à seca (VM05) e tolerantes (VM01) do híbrido *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* cultivado sob condições de estresse hídrico e irrigação. No estudo, o clone apresentou aumento na expressão do gene EgrCPK26 relacionado à abertura e fechamento estomático.

Dubrovina, Kiselev e Khristenko (2013) identificaram genes CDPK regulados transcricionalmente por fatores de estresse abiótico, sendo expressos ativamente sob condições de estresse osmótico e de temperatura em *V. amurensis* de crescimento selvagem. Eles isolaram doze genes CDPK, entre eles, o *V. amurensis* calcium-dependent protein kinase (VaCPK26). A expressão foi modulada diferencialmente em resposta a alto teor de sal, alto manitol, déficit hídrico e condições de estresse térmico. Os dados demonstram que o gene pode estar implicado na sinalização de estresses abióticos e contribuir para a resistência de alto nível de *V. amurensis* a condições ambientais adversas.

A análise comparativa de indivíduos com e sem sintomas de um mesmo genótipo em um mesmo ambiente (1004-A1-CS e 1004-A1-SS) indica que o gene CDPK26 apresenta expressão superior nos indivíduos com sintomas. O mesmo ocorre entre genótipos diferentes (361-A1-CS e 975-A1-SS) em um mesmo ambiente, onde os indivíduos com sintomas possuem expressão superior do gene (Figura 1).

Figura 1 – Comparação relativa da expressão gênica do CDPK26. Nível de expressão relativa dos transcritos nos genótipos: 0361-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 975-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A2-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 2).



Fonte: Próprio autor.

Não obstante, quando se compara plantas assintomáticas e sintomáticas de um mesmo genótipo em ambientes distintos (1004-A1-CS e 1004-A2-SS) nota-se que as assintomáticas possuem expressão maior no ambiente 2 que as doentes no 1. A mesma condição acontece ao se comparar as sadias do 1 com as sadias do 2 (1004-A1-SS e 1004-A2-SS). Ou seja, o clone 1004 no ambiente 2 possui expressão gênica superior independente de ser comparado com plantas sintomáticas ou assintomáticas.

Esses dados sugerem que plantas com sintomas possuem maior expressão do CDPK26, ou seja, há uma expressão gênica diferencial em relação aos indivíduos sadios e doentes. Além disso, o ambiente exerce influência na expressão, pois, no local 2, indivíduos sadios apresentam maior expressão em relação a outros de mesmo genótipo no local 1, tanto sadios como doentes. Isto indica que o gene é menos requerido no A1 e mais no A2. Possivelmente, o segundo ambiente apresenta características pouco favoráveis, enquanto o primeiro possui características mais adequadas para desenvolvimento das plantas. Outro fator relevante é que em genótipos mais tolerantes a condições adversas (aqueles que nunca

apresentaram sintomatologia, 975-A1-SS) o gene foi menos expresso, ou seja, foi menos requerido. Já naqueles que sempre apresentaram sintomatologia independente do ambiente (361-A1-CS), o CDPK26 foi mais expresso, o que evidencia resposta da planta ao estresse para tentar se adaptar e exercer tolerância.

Informações acerca do local A1 e A2 no período analisado revela que houve alternância na intensidade de precipitação, e, também, déficit hídrico nos ambientes. O CDPK26 está associado a processos celulares da planta em resposta ao déficit hídrico. Assim, o aumento da expressão do gene pode ser explicado devido ao estresse abiótico sofrido (baixa disponibilidade de água no solo), pois, para tentar se adaptar, a planta ativa os genes necessários à sua sobrevivência. A tentativa de adaptação, às vezes, é falha. Quando isso ocorre, aparece sintomas do estresse e ela passa a ser rotulada como sensível às condições.

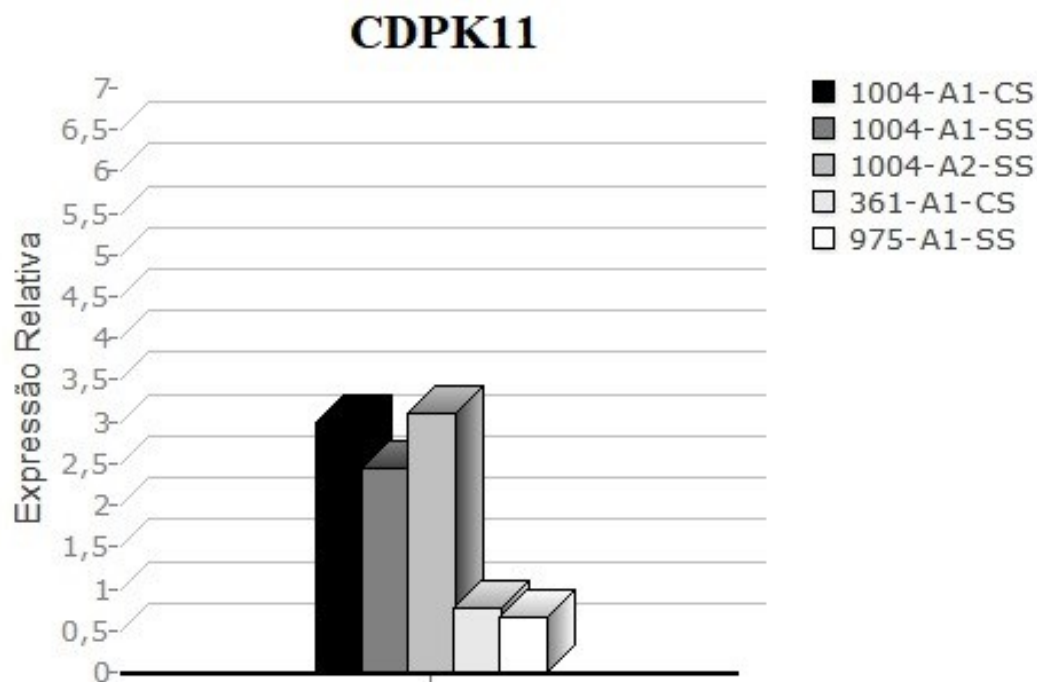
Portanto, os dados mostram que o gene pode estar relacionado às respostas adaptativas destes genótipos ao estresse ambiental do local. Nisso, a expressão do gene é regulada em resposta ao déficit hídrico. Sob limitação de água ocorre aumento da expressão com maior atividade das células guarda que atuam no fechamento estomático para tentar proporcionar menor perda de água e tolerância à seca.

A proteína quinase dependente de cálcio 11 (CDPK11) é um importante regulador positivo nas vias de sinalização ABA mediadas por CDPK/cálcio. Ela controla positivamente a regulação estomática e mantém o equilíbrio hídrico da planta sob condições de estresse abiótico (ZHU *et al.*, 2007). A atividade do gene CDPK confirmada por análises de expressão global demonstra que vários membros são expressos diferencialmente sob distintos níveis de ABA, salinidade, seca, calor e frio. A mudança na expressão dos genes CDPK indica seu papel na adaptação das plantas a estresses abióticos (SINGH; SAGAR; BISWAS, 2017).

Zhu *et al.* (2007) relataram que proteína quinase dependente de cálcio 11 do *Arabidopsis thaliana* (AtCPK11) é regulador positivo em processos de sinalização ABA mediados por CDPK/cálcio envolvendo germinação de sementes, crescimento de plântulas, regulação de células guarda e tolerância de plantas ao estresse salino, fornecendo evidência genética *in planta* para a modulação de CDPK/cálcio na transdução de sinal ABA em nível de planta inteira. Urao *et al.* (1994) verificaram que salinidade e estresse hídrico causaram um aumento no nível de transcrição do AtCPK11 em *Arabidopsis thaliana*. De acordo com Ding *et al.* (2013), o gene proteína quinase dependente de cálcio 11 do milho (ZmCPK11) está envolvido na defesa antioxidante induzida por ABA e funciona a montante de ZmMPK5 na sinalização de ABA.

O CDPK11 em um mesmo genótipo em mesmo ambiente (1004-A1-CS e 1004-A1-SS) apresentou expressão superior nos indivíduos com sintomas (Figura 2).

Figura 2 – Comparação relativa da expressão gênica do CDPK11. Nível de expressão relativa dos transcritos nos genótipos: 0361-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 975-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A2-SS (Genótipo sem sintomas no Ambiente 2).



Fonte: Próprio autor.

O mesmo comportamento também foi observado quando se compara genótipos diferentes (361-A1-CS e 975-A1-SS) em um mesmo ambiente. Em plantas com e sem sintomas de um mesmo genótipo em ambientes distintos (1004-A1-CS e 1004-A2-SS) houve inversão, quando o genótipo sem sintomas expressou mais que o com sintomas. O mesmo ocorre ao se comparar os indivíduos sadios de mesmo genótipo em ambientes diferentes (1004-A1-SS e 1004-A2-SS), pois há uma expressão maior do gene nas plantas do ambiente 2 (sem sintomas). Isto pode ser um indicativo que ambiente 1 possui características um pouco mais adequadas para o desenvolvimento desse genótipo, e, portanto, o CDPK11 é menos requerido nesta condição. A diferença de resposta aos estresses está relacionada a distintos ambientes, não a distintos genótipos.

O déficit hídrico causa várias alterações nas plantas, como fechamento estomático, diminuição do turgor e alterações na composição da parede celular ou das membranas plasmáticas, que podem atuar como um sinal para desencadear respostas de adaptação. Embora

relativamente pouco se saiba sobre os mecanismos para detectar essas mudanças, está bem estabelecido que o ácido abscísico (ABA) é um importante sinal fisiológico que induz as respostas à seca. O aumento no nível de transcrição de CDPK11 nas plantas doentes pode estar relacionado a baixa disponibilidade de água no solo, pois, ele é um regulador positivo nas vias de sinalização ABA, controla positivamente a regulação estomática e tenta manter o equilíbrio hídrico da planta sob condições de estresse abiótico como já relatado em outros estudos.

Os fatores de transcrição WRKY participam de inúmeros processos envolvidos no desenvolvimento vegetal, como germinação de sementes, amadurecimento de frutos, formação de raízes, tempo de floração, entre outros. Representam um dos centros de sinalização da maquinaria genética nas plantas em resposta a diferentes estímulos. Possuem papéis regulatórios importantes na defesa contra estresses bióticos e abióticos, como ataques de vírus, fungos e bactérias patogênicas, estresse térmico, deficiência de nutrientes, estresse salino, frio, UV-B e déficit hídrico. No entanto, relatos exatos na tolerância ao estresse abiótico são mais raros (YANG *et al.*, 2018).

Fan *et al.* (2018) classificaram os WRKY em eucalipto e apresentaram sua expressão em resposta a diferentes hormônios vegetais e estresses de frio e salinidade. Não obstante, ainda é necessário gerar informações a partir de análises de bioinformática e outros estresses.

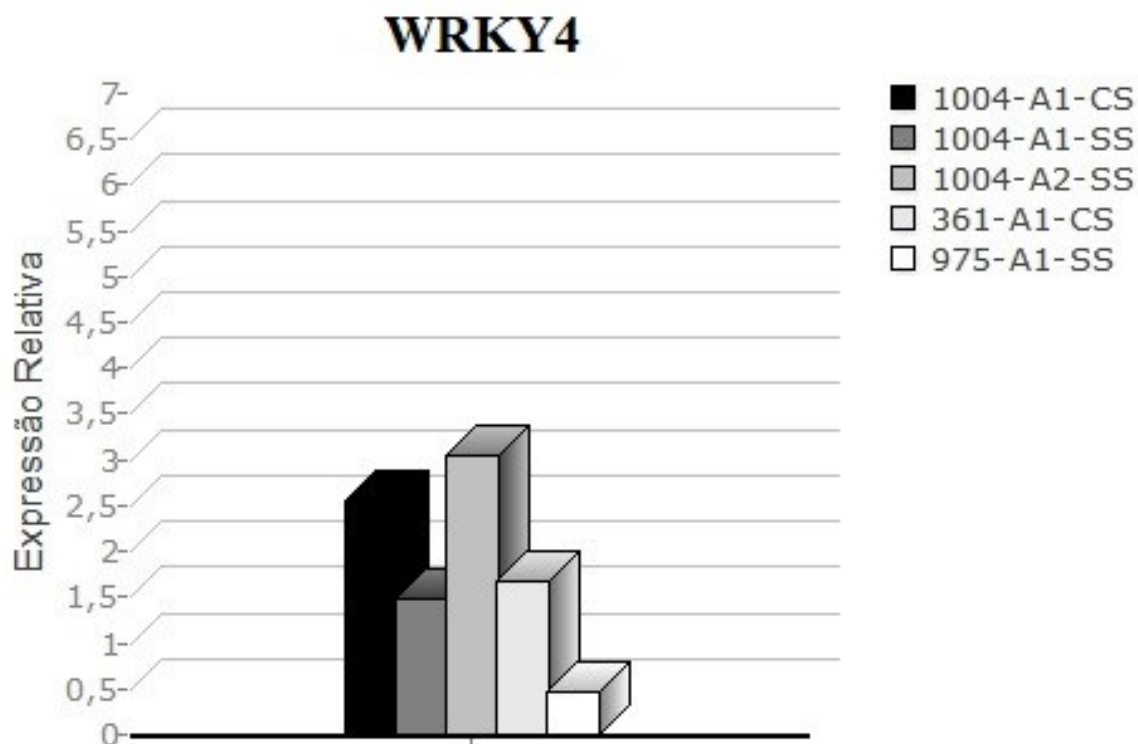
Zheng *et al.* (2013) estudaram o gene ThWRKY4 homólogo ao gene deste trabalho em *Tamarix hispida*. Eles demonstraram um modelo de funcionamento para a função do gene na resposta a estresse abiótico. A superexpressão do ThWRKY4 conferiu tolerância ao tratamento com sal, estresse oxidativo e ABA em plantas transgênicas. O estudo mostrou que ThWRKY4 funciona como um fator de transcrição para modular positivamente as tolerâncias ao estresse abiótico e está envolvido na modulação de espécies reativas de oxigênio.

Ao se comparar indivíduos sadios e doentes de mesmo genótipo em mesmo ambiente (1004-A1-CS e 1004-A1-SS), verifica-se um aumento da expressão do gene WRKY4 nos indivíduos com sintomas do distúrbio. A análise de genótipo que sempre apresenta sintomatologia (361-A1-CS) e genótipo que nunca apresenta (975-A1-SS) em um mesmo ambiente, também indicou maior expressão do gene nos sintomáticos (Figura 3).

Já a análise em ambientes distintos de assintomáticos e sintomáticos de mesmo genótipo (1004-A1-CS e 1004-A2-SS) e, também, de assintomáticos de mesmo genótipo (1004-A1-SS e 1004-A2-SS), indica que os indivíduos que obtiveram maior expressão foram os do ambiente 2 em ambos os casos. Um requerimento maior do WRKY4 indica maior tentativa da planta em tolerar as condições adversas. Logo, o ambiente 2 possui características menos

adequadas para o desenvolvimento delas. Isso sugere que este gene possa estar relacionado às respostas adaptativas destes genótipos ao estresse ambiental dos locais.

Figura 3 – Comparação relativa da expressão gênica do WRKY4. Nível de expressão relativa dos transcritos nos genótipos: 0361-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 975-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A2-SS (Genótipo sem sintomas no Ambiente 2).



Fonte: Próprio autor.

Os WRKYs podem estar associados na defesa contra estresse térmico, deficiência de nutrientes, estresse salino, frio, UV-B e déficit hídrico. Portanto, a expressão do gene é regulada em resposta à tais estresses. O aumento de sua expressão em plantas doentes é um mecanismo de defesa com intuito de aumentar a tolerância a tais estresses por meio da expressão ou não deste gene.

As plantas não podem se mover para ambientes mais favoráveis e têm que lidar com o estresse abiótico *in situ*. Para isso, desenvolveram um conjunto de mecanismos regulatórios para perceber, transduzir e responder aos sinais de estresse nos níveis molecular, celular e fisiológico.

Proteínas semelhantes à calcineurina B (CBLs) representam uma família de proteínas sensoras de cálcio que interagem com um grupo de serina/treonina quinases

designadas como proteínas quinases de interação com CBL (CIPKs). Membros dessa família desempenham papéis importantes nos processos de desenvolvimento da planta, transdução de sinalização de hormônios, na regulação da homeostase dos íons vegetais e na resposta ao estresse abiótico. CIPKs ativados podem subsequentemente transduzir sinais de cálcio por fosforilação dos componentes de sinalização a jusante (HASHIMOTO *et al.*, 2012).

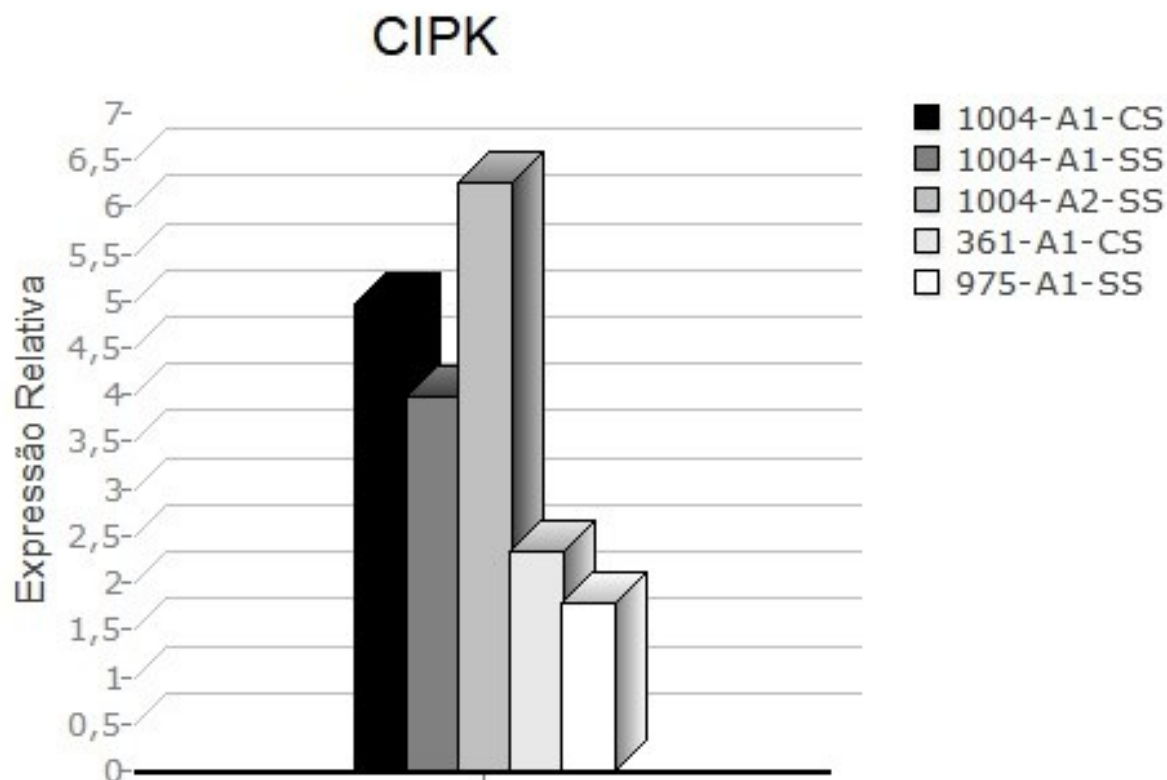
Dentre as proteínas CBL e CIPK já caracterizadas funcionalmente, várias estão envolvidas em rotas de sinalização que mediam especificamente as respostas e adaptação aos estresses salinos, na regulação das respostas ao ácido abscísico, nas respostas transcricionais induzidas por baixas temperaturas, seca e alto pH. No entanto, a função dos genes CIPK em *Eucalyptus* sp. permanece mal definida.

A expressão de CIPK sob estresse já foi detectada em outras espécies. Mo *et al.* (2018) isolaram 26 genes CIPK na mandioca (MeCIPK) por pesquisa de genoma e clonagem de sequências de cDNA de *Arabidopsis*. Os padrões de expressão dos 26 genes em resposta a NaCl, PEG, estresse de calor e frio foram analisados por RT-qPCR. A expressão de cada um foi induzida por múltiplos estímulos. Esses resultados sugeriram que a rede de sinais CBL-CIPK da mandioca pode desempenhar papéis importantes na resposta a estresses abióticos. Aslan *et al.* (2019) identificaram um total de 8 genes *AcCBL* e 21 *AcCIPK* em todo o genoma do abacaxi. A análise dos dados transcricionômicos mostrou que os genes foram expressos diferencialmente em diferentes tecidos. Além disso, a análise da expressão em diferentes tecidos mostrou mudanças significativas sob vários estímulos abióticos. A expressão ectópica de *AcCBL1* em *Arabidopsis* resultou em maior tolerância à salinidade, osmose e estresse fúngico. O estudo revelou a contribuição crucial do gene CBL-CIPK em vários processos biológicos e fisiológicos no abacaxi.

A análise de indivíduos com e sem sintomas de um mesmo genótipo em um mesmo ambiente (1004-A1-CS e 1004-A1-SS) demonstra que o CIPK apresenta expressão superior nos indivíduos com sintomas. Em relação a análise em mesmo ambiente de genótipos que sempre apresentaram sintomatologia (361-A1-CS) e genótipos que nunca apresentaram (975-A1-SS), também houve maior expressão do gene nos sintomáticos (Figura 4).

Porém, ao se comparar plantas com e sem sintomas de um mesmo genótipo em ambientes diferentes (1004-A1-CS e 1004-A2-SS), o resultado indica que as plantas sadias do ambiente A2 tiveram maior expressão que as doentes do A1. A mesma condição acontece ao se comparar as sadias do A1 e A2 (1004-A1-SS e 1004-A2-SS).

Figura 4 – Comparação relativa da expressão gênica do CIPK. Nível de expressão relativa dos transcritos nos genótipos: 0361-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 975-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A2-SS (Genótipo sem sintomas no Ambiente 2).



Fonte: Próprio autor.

Os resultados sugerem que o CIPK está associado ao distúrbio, pois, plantas com sintomas possuem expressão superior, ou seja, há uma expressão gênica diferencial do gene em relação a indivíduos sadios e doentes. Outro ponto a destacar é que o ambiente exerce influência, já, que no ambiente 2 indivíduos sadios apresentaram expressão superior que outros de mesmo genótipo no A1, tanto sadios como doentes. O ambiente 2, possivelmente, apresenta características pouco favoráveis para o genótipo em questão, enquanto o ambiente 1 apresenta características mais adequadas.

Dentre as proteínas de CIPK já caracterizadas funcionalmente, várias estão envolvidas em rotas de sinalização que mediam especificamente respostas e adaptação a estresses salinos, regulação de ácido abscísico e respostas transcricionais induzidas por temperaturas. Raramente os estresses manifestam-se isoladamente, podendo ter vários fatores interligados, o que agrava os efeitos nas plantas e gera uma complexa rede de sinalização. Portanto, a expressão desse gene pode ser regulada em resposta à um conjunto de estresses. Sob limitação de condições ambientais adequadas pode ocorrer expressão superior como tentativa da planta em se adaptar e prover tolerância por meio do gene.

A superfamília do fator de transcrição MYB é uma grande família de genes que desempenha papéis centrais nos processos de desenvolvimento e respostas de defesa em plantas. Esses genes regulam a diferenciação celular, formação de órgãos, morfogênese foliar, metabolismo secundário e respostas ao estresse abiótico (AMBAWAT *et al.*, 2013).

A família de proteínas MYB em plantas é caracterizada pela presença de um domínio MYB de ligação ao DNA conservado que, normalmente, contém de uma a quatro repetições imperfeitas (LI; NG; FAN, 2015).

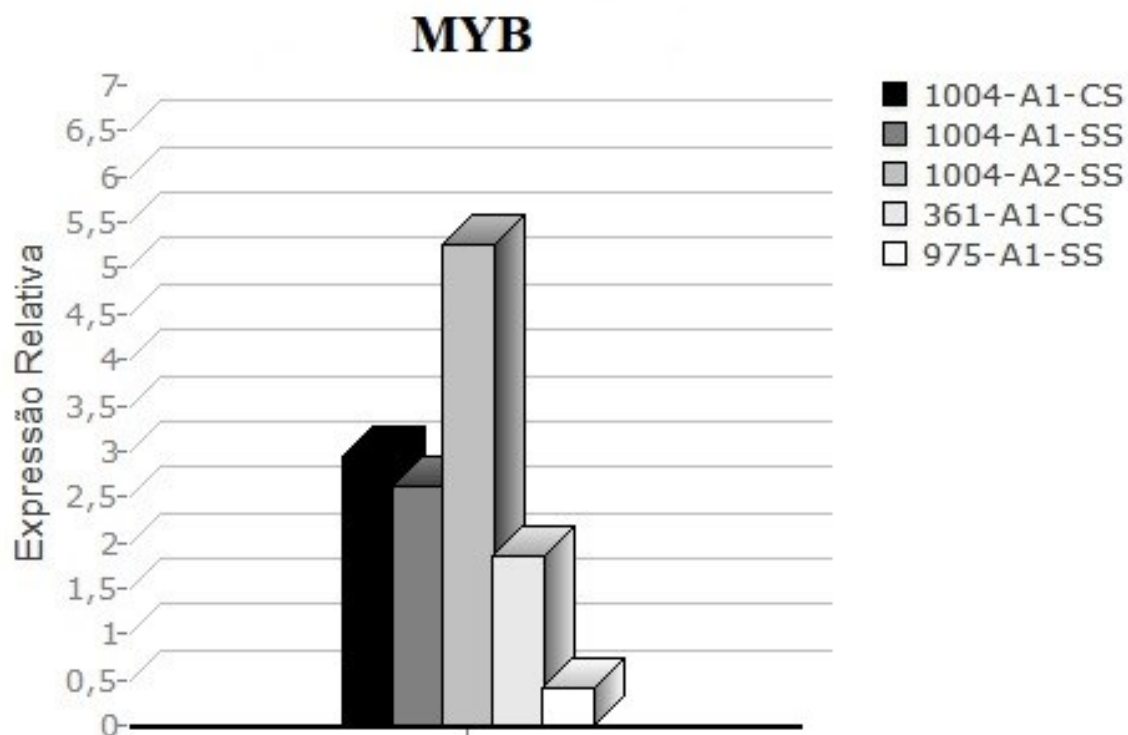
Segundo Abe *et al.* (2003), proteínas como AtMYC2 e AtMYB2 desempenham papéis importantes como fatores de transcrição na expressão do gene dependente de ABA sob seca e estresse salino. Denekamp e Smeekens (2003) relataram que o AtMYB102 é um componente-chave para integrar as vias de sinalização nas respostas de *Arabidopsis* a ferimentos, estresse osmótico e ABA. Outros estudos revelaram que as proteínas MYB em *Arabidopsis* (AtMYB44, AtMYB60 e AtMYB61) estão envolvidas na regulação da abertura estomática em resposta ao estresse hídrico (COMINELLI *et al.*, 2005; LIANG *et al.*, 2005; JUNG *et al.*, 2008). He *et al.* (2012) indicaram que TaMYB73 em trigo induz a expressão de genes de sinalização de estresse e aumenta a tolerância à salinidade em *Arabidopsis* transgênica. A superexpressão de OsMYB48-1 induz a expressão de genes de resposta ao estresse e melhora a salinidade e a tolerância ao estresse por seca no arroz (XIONG *et al.*, 2014). Fang *et al.* (2018) relataram que o MYB TF AtDIV2 desempenha papéis negativos no estresse salino e é necessário para a sinalização ABA em *Arabidopsis*. Yang, Dai, Zhang (2012) isolaram um gene MYB do tipo R2R3 de arroz, OsMYB2, e caracterizaram funcionalmente seu papel na tolerância ao estresse abiótico. Em seus resultados, relataram que o OsMYB2 codifica um fator de transcrição MYB responsivo ao estresse que desempenha um papel regulador na tolerância do arroz ao sal, frio e estresse por desidratação.

A expressão do MYB apresentou variação entre indivíduos com e sem sintomas de um mesmo genótipo em mesmo ambiente (1004-A1-CS e 1004-A1-SS), sendo, superior nas plantas sintomáticas. Na análise de genótipos que sempre apresentaram sintomatologia (361-A1-CS) e genótipos que nunca apresentaram (975-A1-SS), em mesmo ambiente, também foi verificado um aumento da expressão do gene nas plantas sintomáticas (Figura 5).

Já quando se compara plantas de um mesmo genótipo em ambientes distintos (1004-A1-CS e 1004-A2-SS), indivíduos assintomáticos do ambiente 2 possuem praticamente o dobro da expressão que os sintomáticos do A1 e, também, que os assintomáticos (1004-A1-SS e 1004-A2-SS). Isso evidencia a influência dos distintos ambientes na expressão gênica

diferencial do MYB. O ambiente 2, possivelmente, apresenta condições adversas mais acentuadas.

Figura 5 – Comparação relativa da expressão gênica do MYB. Nível de expressão relativa dos transcritos nos genótipos: 0361-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 975-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A2-SS (Genótipo sem sintomas no Ambiente 2).



Fonte: Próprio autor.

Assim, é possível verificar que o MYB desempenha um papel central na resposta das plantas aos estresses sob o distúrbio, e, portanto, podem ser alvos ideais para o melhoramento e a seleção de genótipos superiores tolerantes a estes estresses.

Aquaporinas (AQPs) são canais de membrana implicados na transferência de água e pequenos solutos através das membranas celulares. Possuem papéis importantes em vários processos fisiológicos das plantas, incluindo crescimento, desenvolvimento e adaptação ao estresse (MAUREL *et al.*, 2015).

Estresses abióticos como deficit hídrico e salinidade do solo podem alterar o transporte de água na planta. Mecanismos de ajuste para preservar o balanço e a homeostase hídrica passam a ser requeridos. Dentre os genes altamente induzidos pelas condições adversas encontram-se os que codificam as aquaporinas (KAPILAN; VAZIRI; ZWIAZEK, 2018). O

nível de expressão das AQPs pode aumentar, diminuir ou permanecer inalterado dependendo da duração e intensidade do estresse (SANTOS; MAZZAFERA, 2013).

Diversos estudos têm demonstrado um aumento do nível de transcritos de genes AQPs durante estresse hídrico em várias espécies de plantas como em café (SANTOS; MAZZAFERA, 2013), milho (RUIZ-LOZANO *et al.*, 2009), tabaco (MAHDIEH *et al.*, 2008), arroz (LIAN *et al.*, 2004) e *Arabidopsis* (JANG *et al.*, 2004).

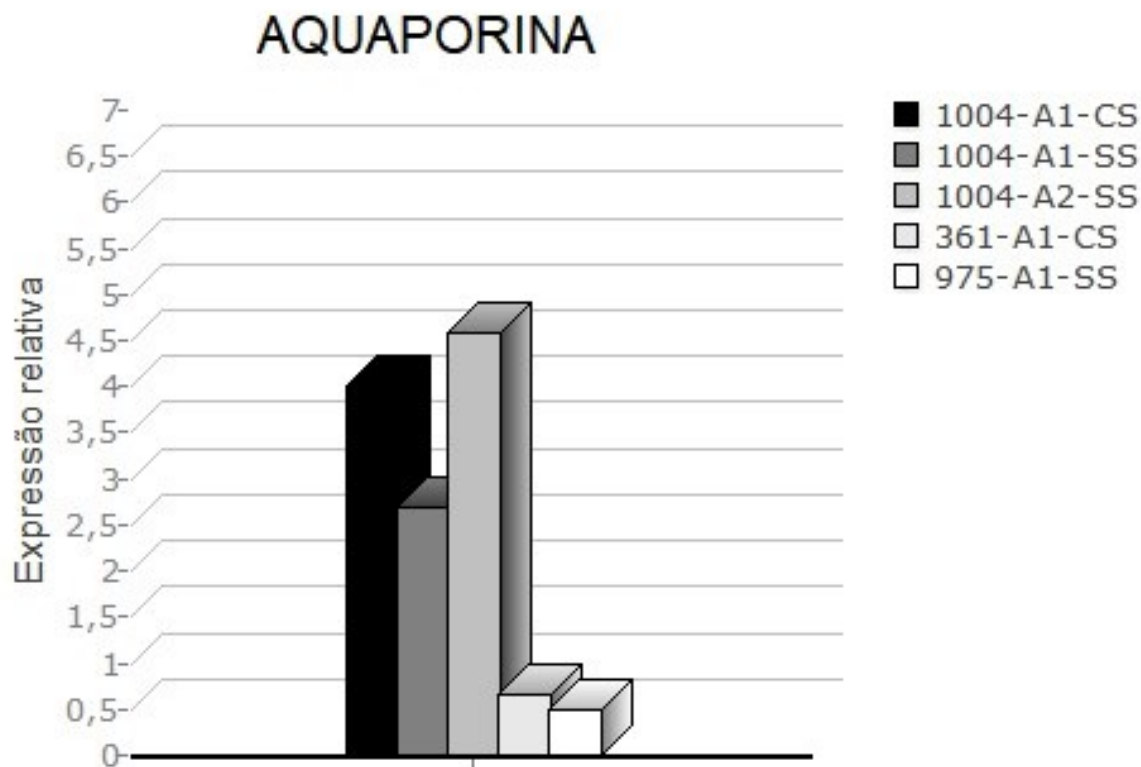
As aquaporinas vegetais podem ser classificadas em cinco subfamílias: Proteínas Intrínsecas de Membrana Plasmática (PIPs, Plasma membrane Intrinsic Proteins), Proteínas Intrínsecas de Tonoplasto (TIPs, Tonoplast Intrinsic Proteins), Proteínas Intrínsecas do tipo Nodulina-26 (NIPs, NOD26- like Intrinsic Proteins), Proteínas Intrínsecas Pequenas (SIPs, Small basic Intrinsic Proteins) e Proteínas Intrínsecas X (XIPs, X Intrinsic Proteins), sendo essas últimas recentemente descobertas e ainda sem função conhecida. Apesar dos nomes de algumas subfamílias remeterem a localizações subcelulares, essa associação nem sempre é verdadeira. Além da classificação em subfamílias, análises filogenéticas permitem uma classificação ainda mais detalhada em subgrupos. Por exemplo, a subfamília TIP pode ser dividida em TIP1, TIP2, TIP3, TIP4 e TIP5 (LI; SANTONI; MAUREL, 2014).

Os membros da subfamília TIP estão envolvidos no controle da permeabilidade do tonoplasto à água e outros solutos. Estudos sobre a expressão de um conjunto de genes TIP evidenciaram regulação diferencial em resposta a restrições ambientais, especialmente seca e salinidade, e ao ácido abscísico (ABA). TIPs participam da regulação de processos fisiológicos que contribuem para o desenvolvimento da planta e adaptação ao estresse (RODRIGUES *et al.*, 2016). Apesar do conhecimento acumulado em espécies modelo, pouco se sabe sobre a organização da subfamília TIP em espécies lenhosas, especialmente em eucaliptos.

Martins *et al.* (2017) relataram que o CsTIP2-1 desempenha um papel ativo na regulação da água e estado oxidativo necessário para o crescimento da planta, fornece adaptação a condições ambientais de estresse, sendo que, melhora na tolerância ao sal e à seca ao aumentar a expansão celular, a desintoxicação de H₂O₂ e a condutância estomática. Zhang *et al.* (2017) estabeleceram o GmTIP2-1 como um gene responsivo ao estresse que confere tolerância ao estresse salino na soja.

Em plantas sintomáticas e assintomáticas de um mesmo genótipo em mesmo ambiente (1004-A1-CS e 1004-A1-SS) as aquaporinas apresentam expressão superior em indivíduos com sintomas. Em relação ao mesmo ambiente entre genótipos que sempre apresentaram sintomatologia (361-A1-CS) e genótipos que nunca apresentaram (975-A1-SS), assintomáticos possuem uma maior expressão desse gene (Figura 6).

Figura 6 – Comparação relativa da expressão gênica da Aquaporina. Nível de expressão relativa dos transcritos nos genótipos: 0361-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 975-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-CS (Genótipo com sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A1-SS (Genótipo sem sintomas inserido no Ambiente 1); 1004-A2-SS (Genótipo sem sintomas no Ambiente 2).



Fonte: Próprio autor.

Já quando se compara indivíduos com e sem sintomas de um mesmo genótipo em ambientes diferentes (1004-A1-CS e 1004-A2-SS) se nota que no ambiente 2 as plantas sadias tiveram maior expressão que as doentes no A1. O mesmo ocorre ao se comparar os assintomáticos do A1 e A2 (1004-A1-SS e 1004-A2-SS).

Sob condições ambientais adversas as plantas precisam ajustar seus balanços hídricos em resposta a inúmeras tensões, tais como déficit de água, sais e alta temperatura. Respostas ao estresse proporcionam mudanças complexas na expressão do gene, as quais modificam o estado fisiológico da planta e podem levar a uma maior tolerância ao estresse ou a ocorrência de sintomas por não adaptação. O acúmulo diferencial deste gene nos tecidos foliares de eucalipto com sintomas está relacionado à tentativa da planta de adaptação. Sob condições normais, os canais de AQPs mantêm-se abertos. Durante a seca e/ou inundação, a sua expressão é induzida, ocorrendo o fechamento dos canais como mecanismo de proteção às variações ambientais. Este resultado, destaca, portanto, a importância das AQP, a qual mantém o fluxo coordenado de água durante o crescimento e durante os estágios de desenvolvimento de

órgãos da planta, reforçando a importância do transporte de água mediado por estas proteínas em resposta a estresses ambientais.

Devido a deficiência hídrica ocorrida na área de estudo e o fato de que as aquaporinas têm sua expressão regulada em condições desfavoráveis ao desenvolvimento da planta, supõe-se que a ativação da expressão dos genes desta proteína no material doente pode ter sido causada em resposta aos estresses abióticos ocorridos no local.

4.CONCLUSÃO

Foram detectadas alterações de expressão gênica em clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* afetados por distúrbio fisiológico. Os resultados sugerem que a expressão gênica diferencial observada pode ser decorrente das alterações edafoclimáticas ocorridas no local. Todos os seis genes selecionados (CDPK26, CIPK, WRKY4, CDPK11, MYB e AQUAPORINA TIP2-1) podem ser indicativos da ocorrência de estresse nas plantas com sintomas. A fim de melhorar a compreensão dos mecanismos exatos da ação gênica pesquisas adicionais são necessárias. Outros genes devem ser investigados para isolar completamente as causas desse distúrbio. O ambiente 2 provoca nas plantas uma expressão gênica diferente daquela induzida pelo ambiente 1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H. *et al.* Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **The Plant Cell**, v. 15, n. 1, p. 63-78, 2003.
- ABRAF, Anuário Estatístico da ABRAF. Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. 2013.
- ALI, N.; HADI, F. CBF/DREB transcription factor genes play role in cadmium tolerance and phytoaccumulation in *Ricinus communis* under molybdenum treatments. **Chemosphere**, v. 208, p. 425-432, 2018.
- AMBAWAT, S. *et al.* MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 3, p. 307-321, 2013.
- ANDRADE, J. C. F. D. Análise de expressão gênica diferencial em genótipo de cana-de-açúcar tolerante ao estresse hídrico, usando real-time RT-PCR. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2010.
- ASHRAF, M. F. M. R.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.
- ASLAM, M. *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of CBL-CIPK gene family in pineapple (*Ananas comosus*) and the role of AcCBL1 in abiotic and biotic stress response. **Biomolecules**, v. 9, n. 7, p. 293, 2019.
- BENSON, D. A. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Database issue, p. D30, 2015.
- BOUDSOCQ, M.; SHEEN, J. CDPKs in immune and stress signaling. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 1, p. 30-40, 2013.
- CHARRIER, A. *et al.* Medicago truncatula stress associated protein 1 gene (MtSAP1) overexpression confers tolerance to abiotic stress and impacts proline accumulation in transgenic tobacco. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 9, p. 874-877, 2013.
- CHEN, J. *et al.* Genome-wide identification, classification and expression analysis of the HSP gene superfamily in tea plant (*Camellia sinensis*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2633, 2018.
- CHEN, Y.; HAO, X.; CAO, J. Small auxin upregulated RNA (SAUR) gene family in maize: identification, evolution, and its phylogenetic comparison with Arabidopsis, rice, and sorghum. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 2, p. 133-150, 2014.
- CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J. K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 395, p. 225-236, 2004.

- CLARK, K. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D67-D72, 2016.
- COMINELLI, E. *et al.* A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. **Current Biology**, v. 15, n. 13, p. 1196-1200, 2005.
- DENEKAMP, M.; SMEEKENS, S. C. Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene. **Plant Physiology**, v. 132, n. 3, p. 1415-1423, 2003.
- DE SOUZA, A. *et al.* Identification and functional characterization of the distinct plant pectin esterases PAE8 and PAE9 and their deletion mutants. **Planta**, v. 240, n. 5, p. 1123-1138, 2014.
- DING, Y. *et al.* ZmCPK11 is involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and functions upstream of ZmMPK5 in abscisic acid signalling in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 4, p. 871-884, 2013.
- DONG, Y. *et al.* A novel bHLH transcription factor PebHLH35 from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in *Arabidopsis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 453-458, 2014.
- DUBROVINA, A. S.; KISELEV, K. V.; KHRISTENKO, V. S. Expression of calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 17, p. 1491-1500, 2013.
- EBEL, C. *et al.* Characterization of wheat (*Triticum aestivum*) TIFY family and role of *Triticum Durum* Td TIFY11a in salt stress tolerance. **PloS One**, v. 13, n. 7, p. e0200566, 2018.
- ELHITI, M.; STASOLLA, C. Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 2, p. 86-88, 2009.
- FAN, C. *et al.* Genome-wide analysis of *Eucalyptus grandis* WRKY genes family and their expression profiling in response to hormone and abiotic stress treatment. **Gene**, v. 678, p. 38-48, 2018.
- FANG, Q. *et al.* AtDIV2, an RR-type MYB transcription factor of *Arabidopsis*, negatively regulates salt stress by modulating ABA signaling. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 11, p. 1499-1511, 2018.
- FONSECA, S. *et al.* Manual prático de melhoramento genético do eucalipto. (pp. 39-42). **Editora UFV-Universidade Federal de Viccedil**, 2010.
- GOODSTEIN, D. M. *et al.* Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D1178-D1186, 2012.
- HASHIMOTO, K. *et al.* Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 11, p. 7956-7968, 2012.

HE, M.; HE, C. Q.; DING, N. Z. Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1771, 2018.

HE, Y. *et al.* Ectopic expression of a wheat MYB transcription factor gene, TaMYB73, improves salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 3, p. 1511-1522, 2012.

HONG-BO, S.; ZONG-SUO, L.; MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3-4, p. 131-135, 2005.

HU, R. *et al.* Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 1-23, 2010.

HUANG, X. S. *et al.* A basic helix-loop-helix transcription factor, PtrbHLH, of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates peroxidase-mediated scavenging of hydrogen peroxide. **Plant Physiology**, v. 162, n. 2, p. 1178-1194, 2013.

ICHIMURA, K. *et al.* Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 7, p. 301-308, 2002.

JANG, J. Y. *et al.* An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 54, n. 5, p. 713-725, 2004.

JUNG, C. *et al.* Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 146, n. 2, p. 623-635, 2008.

KAPILAN, R.; VAZIRI, M.; ZWIAZEK, J. J. Regulation of aquaporins in plants under stress. **Biological Research**, v. 51, n. 1, p. 1-11, 2018.

KUDLA, J.; BATISTIČ, O.; HASHIMOTO, K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. **The Plant Cell**, v. 22, n. 3, p. 541-563, 2010.

LI, C.; NG, C. K.-Y.; FAN, L.-M. MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. **Environmental and Experimental Botany**, v. 114, p. 80-91, 2015.

LI, G.; SANTONI, V.; MAUREL, C. Plant aquaporins: roles in plant physiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 5, p. 1574-1582, 2014.

LIAN, H.-L. *et al.* The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 4, p. 481-489, 2004.

LIANG, Y.-K. *et al.* AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor controlling stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, v. 15, n. 13, p. 1201-1206, 2005.

MAHDIEH, M. *et al.* Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 5, p. 801-813, 2008.

MARTINS, C. PS *et al.* Expression of the citrus CsTIP2; 1 gene improves tobacco plant growth, antioxidant capacity and physiological adaptation under stress conditions. **Planta**, v. 245, n. 5, p. 951-963, 2017.

MARTINS, G. S. *et al.* Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 229, p. 122-131, 2018.

MAUREL, C. *et al.* Aquaporins in plants. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 4, p. 1321-1358, 2015.

MIWA, K. *et al.* Roles of BOR2, a boron exporter, in cross linking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 163, n. 4, p. 1699-1709, 2013.

MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2, p. 86-96, 2012.

MO, C. *et al.* Expression patterns and identified protein-protein interactions suggest that cassava CBL-CIPK signal networks function in responses to abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 269, 2018.

MYBURG, A. A. *et al.* The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356-362, 2014.

NELSON, D.; WERCK-REICHHART, D. A P450-centric view of plant evolution. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 194-211, 2011.

PIZZIO, G. A. *et al.* The PYL4 A194T mutant uncovers a key role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA interaction for abscisic acid signaling and plant drought resistance. **Plant Physiology**, v. 163, n. 1, p. 441-455, 2013.

QI, T. *et al.* The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 23, n. 5, p. 1795-1814, 2011.

QIU, T. *et al.* The tissue-specific and developmentally regulated expression patterns of the SAUR41 subfamily of small auxin up RNA genes: potential implications. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 8, p. e25283, 2013.

RAO, S. S. *et al.* Overexpression of GmCaM4 in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 2, p. 145-160, 2014.

RODRIGUES, M. I. *et al.* The eucalyptus tonoplast intrinsic protein (TIP) gene subfamily: genomic organization, structural features, and expression profiles. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1810, 2016.

RODRIGUEZ, M. C. S.; PETERSEN, M.; MUNDY, J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 621-649, 2010.

RUIZ-LOZANO, J. M. *et al.* Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins. **Plant Molecular Biology**, v. 70, n. 5, p. 565, 2009.

SANTOS, A. B. D.; MAZZAFERA, P. Aquaporins and the control of the water status in coffee plants. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 2, p. 79-93, 2013.

SINGH, A.; SAGAR, S.; BISWAS, D. K. Calcium dependent protein kinase, a versatile player in plant stress management and development. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 36, n. 5-6, p. 336-352, 2017.

SWEETMAN, C. *et al.* Salt-induced expression of intracellular vesicle trafficking genes, CaRab-GTP, and their association with Na⁺ accumulation in leaves of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 918p., 2013.

TAKANO, J. *et al.* Arabidopsis boron transporter for xylem loading. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 337-340, 2002.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115-e115, 2012.

URAO, T. *et al.* Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 244, n. 4, p. 331-340, 1994.

Wikigenes. DREB1A - dehydration-responsive element-binding. Disponível em: <<https://www.wikigenes.org/e/gene/e/828652.html>> Acesso em: 01 jan. 2021.

XIONG, H. *et al.* Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e92913, 2014.

XU, J. *et al.* AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 231, n. 6, p. 1251-1260, 2010.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. DREB regulons in abiotic-stress-responsive gene expression in plants. In: **Molecular Breeding of Forage and Turf**. Springer, New York, NY, 2009. p. 15-28.

YANG, A.; DAI, X.; ZHANG, W.-. A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 7, p. 2541-2556, 2012.

YANG, X. *et al.* Identification and expression analyses of WRKY genes reveal their involvement in growth and abiotic stress response in watermelon (*Citrullus lanatus*). **PloS One**, v. 13, n. 1, p. e0191308, 2018.

YU, D.; CHEN, C.; CHEN, Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. **The Plant Cell**, v. 13, n. 7, p. 1527-1540, 2001.

ZHANG, D.-Y. *et al.* Genome-wide identification of major intrinsic proteins in Glycine soja and characterization of GmTIP2; 1 function under salt and water stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

ZHANG, F. *et al.* Characterization of the calcineurin B-Like (CBL) gene family in maize and functional analysis of ZmCBL9 under abscisic acid and abiotic stress treatments. **Plant Science**, v. 253, p. 118-129, 2016.

ZHANG, M. *et al.* Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 12, p. 1241-1252, 2009.

ZHENG, L. *et al.* A WRKY gene from *Tamarix hispida*, ThWRKY4, mediates abiotic stress responses by modulating reactive oxygen species and expression of stress-responsive genes. **Plant Molecular Biology**, v. 82, n. 4-5, p. 303-320, 2013.

ZHU, S.-Y. *et al.* Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 19, n. 10, p. 3019-3036, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da identificação de genes diferencialmente expressos em plantas sintomáticas, bem como, a compreensão de suas funções, foi possível correlacionar especificidades fisiológicas e genéticas que podem ter desencadeado o desenvolvimento do distúrbio nos clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. A identificação de genes com papel nas respostas aos diferentes estresses abióticos é fundamental para elucidar mecanismos específicos de adaptação e resistência de futuros genótipos.